



Tomographie de cohérence optique plein champ pour l'endoscopie : microscopie in situ et in vivo des tissus biologiques

Anne Latrive

► To cite this version:

Anne Latrive. Tomographie de cohérence optique plein champ pour l'endoscopie : microscopie in situ et in vivo des tissus biologiques. Optique [physics.optics]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. <pastel-00782552>

HAL Id: pastel-00782552

<https://pastel.archives-ouvertes.fr/pastel-00782552>

Submitted on 30 Jan 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité

Optique Physique

(ED 389 - La Physique de la Particule à la Matière Condensée)

Préparée à l'INSTITUT LANGEVIN - ONDES ET IMAGES

Présentée par

Anne LATRIVE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

Tomographie de Cohérence Optique Plein Champ pour l'endoscopie : Microscopie *in situ* et *in vivo* des tissus biologiques

Soutenue le 22 novembre 2012

devant le jury composé de :

M.	LASSER	Théo	Rapporteur
M.	SAINT-JALMES	Hervé	Rapporteur
Mme	BOURG-HECKLY	Geneviève	Présidente
M.	SALAMERO	Jean	Examineur
M.	TAVITIAN	Bertrand	Examineur
M.	BOCCARA	Claude	Directeur de thèse
M.	CARMINATI	Rémi	Membre invité
M.	DE BAZELAIRE	Cédric	Membre invité

Remerciements

Ces trois années de doctorat, au sein de l’Institut Langevin et de LLTech, ont été pour moi une très belle expérience scientifique et humaine.

J’ai eu la chance de pouvoir travailler avec Claude Boccara, un directeur de thèse exceptionnel, que je tiens à remercier vivement. Claude, au savoir déjà immense, est toujours ouvert à la discussion et prêt à de nouvelles interrogations, en véritable scientifique. Il m’a guidée dans cette thèse, s’est battu avec moi sur les difficultés rencontrées, sans hésiter à mettre la main à la pâte et manier le tournevis, tout en me faisant confiance et en me laissant l’autonomie de gérer mes travaux. J’ajouterais sur le plan humain que c’est un plaisir de côtoyer une personne aussi agréable et intéressante. Claude m’a fait partager sa science et son expérience, maintes anecdotes cocasses, et de nombreux paquets de bonbons !

J’aimerais aussi remercier Bertrand de Poly, président de LLTech, qui m’a chaleureusement accueillie au sein de cette société à ses débuts. Bertrand apporte son élan et son dynamisme à nos projets.

Au fil de mes études, je me suis peu à peu orientée vers les sciences physiques, puis l’imagerie et l’optique, et pour cela je remercie en particulier mon professeur Rémi Carminati. Rémi m’a non seulement encouragée dans cette voie et ouvert les portes de l’Institut, mais surtout il m’en a donné l’envie par son enthousiasme scientifique communicatif.

Mes travaux n’auraient pu se faire sans l’aide et les précieux conseils de mes collègues, collaborateurs, et amis, que je remercie ici : Fabrice, Franck, Charles, Amir, Osnath, mais aussi Eugénie, Kate, Emilie, Sylvie, et les stagiaires Thomas et Sophie.

Merci de plus aux sympathiques techniciens et gestionnaires, qui se sont occupés de mes innombrables commandes : Emmanuel, Patricia, Abdel, Stéphanie, Delphine, Christelle, et Lorraine.

Je ne peux compter tous les bons moments partagés au sein du laboratoire, et les amitiés qui y sont nées. Je garderai le souvenir de nos grandes discussions métaphysiques, nos dissertations gastronomiques interminables et nos dégustations culinaires, nos rencontres sportives de haut niveau, nos soirées apéritives et festives, et nos magnifiques vacances. Un grand merci à Seb, Sylvain, Yannick, Gilles, Karla, Salma, Sarah, Virginie, Etienne, Mickael, Rémi, Caroline, Jonas, Emilie, Camille, Nicolas, Fabien, Amir, Baptiste, Yann, Daria, Ariadna, Laurent, Olivier, Alex, Marc, Mai, Bastien, Alexandre, Geoffroy... Merci à mes joyeux co-bureaux, sept énergumènes qui ont égayé mon été pendant les moments difficiles de la rédaction !

Enfin, parce que leur présence à mes côtés m'est essentielle, je remercie du fond du coeur mes proches, ma famille, et mon Fabien.

Merci à tous !



L'imagerie optique biomédicale est confrontée aux phénomènes d'absorption et de diffusion de la lumière par les tissus qui atténuent et brouillent le signal au cours de sa propagation.

Nous nous intéressons ici à la Tomographie de Cohérence Optique (OCT) qui image les photons balistiques par interférométrie en lumière temporellement incohérente. En particulier, l'approche Plein Champ atteint une résolution de 1 μm , mais sa profondeur de pénétration ne dépasse pas 1 mm. Il est donc impossible d'imager les organes internes *in vivo* et *in situ* : il faut pour cela disposer d'un instrument doté d'un endoscope, ce qui n'avait pas été réalisé à ce jour.

Nous proposons un système d'OCT Plein Champ avec endoscope flexible qui repose sur le couplage de deux interféromètres, l'un extérieur à la sonde et l'autre situé à l'extrémité de la sonde en contact avec le tissu. Ainsi la sonde est entièrement passive et le signal interférométrique qui la traverse n'est pas perturbé par l'environnement. Sa flexibilité lui permettrait d'imager des organes internes comme le colon. Cependant l'utilisation d'un faisceau de plusieurs milliers de fibres optiques a fait apparaître un signal d'interférence parasite dû aux phénomènes de couplage inter-coeurs et inter-modes. Des solutions sont alors proposées et mises en oeuvre pour s'en affranchir et permettre l'imagerie d'échantillons de tissus.

En imagerie par endoscopie rigide deux systèmes ont été réalisés et sont comparés, avec un ou deux interféromètres, et une sonde composée de lentilles à gradient d'indice. Cette sonde peut imager directement au contact des zones comme la peau, ou en pénétrant l'organe à la manière d'une aiguille, par exemple dans le sein. Elle est assez performante pour être utilisée *in vivo* sur la peau.

Mots clés : Imagerie biomédicale, Tomographie de Cohérence Optique Plein Champ, Endoscopie, Interférences, Fibres optiques, Lentilles GRIN.

The main challenges of biomedical optical imaging methods are absorption and scattering of light by the tissue, which alter the signal and limit the imaging depth.

Here we are interested in Optical Coherence Tomography (OCT), a technique that selects ballistic photons using low coherence interferometry in order to virtually slice inside the tissue. The so-called Full-Field approach achieves an isotropic resolution of 1 μm , but cannot image deeper than 1 mm. It is thus impossible to image internal organs *in vivo* and *in situ* : an endoscopic system is needed. The adaptation of Full-Field OCT for endoscopy had not yet been realized.

We propose a Full-Field OCT system with a flexible endoscope based on the coupling of two interferometers, one external to the probe and the other situated at the tip of the probe in contact with the tissue. This makes the probe entirely passive and insensitive to environment-induced perturbations. The flexible endoscope could access organs such as the colon. However the probe is a bundle made of thousands of optical fibers, so that a parasitic interferometric signal arises from coupling between cores and modes. We have found and tested different solutions to get rid of these stray signals and allow imaging of tissue.

Concerning rigid endoscopy we have built two setups, with either one or two interferometers, and compared both methods. The probe is an assembly of graded-index lenses, it can be applied in contact on areas like skin or it can be inserted as a needle inside organs like breast. This system has been demonstrated for *in vivo* human skin imaging.

Keywords : Biomedical Imaging, Full-Field Optical Coherence Tomography, Endoscopy, Interferences, Optical fibers, GRIN lenses.

Table des matières

Introduction	xi
I Imagerie optique biomédicale et endoscopie	1
1 Problématiques du transport de la lumière dans des milieux biologiques	3
1.1 L'absorption de la lumière par les tissus	4
1.1.1 Le phénomène d'absorption	4
1.1.2 La fenêtre thérapeutique optique	4
1.2 La diffusion de la lumière par les tissus	5
1.2.1 Le phénomène de diffusion	5
1.2.2 Paramètres de diffusion des tissus biologiques	6
1.3 L'atténuation du signal optique en profondeur	7
1.3.1 L'extinction exponentielle du signal	7
1.3.2 Conclusion sur les stratégies d'imagerie possibles	8
2 Différentes approches d'imagerie optique dans les milieux diffusants	9
2.1 Imagerie des photons multidiffusés	10
2.1.1 Imagerie optique des photons multidiffusés	10
2.1.2 Imagerie multimodale des photons multidiffusés	11
2.1.3 Conclusion	12
2.2 Imagerie des photons balistiques	13
2.2.1 Notions essentielles de microscopie classique	14
2.2.2 Filtrage spatial	15
2.2.3 Filtrage temporel	18
2.3 Imagerie par OCT : la Tomographie de Cohérence Optique	20
2.3.1 Principes généraux de l'OCT	20
2.3.2 L'approche OCT Plein Champ	23
2.3.3 Conclusion	28
3 Imager <i>in situ</i> : l'imagerie optique couplée à l'endoscopie	31
3.1 L'endoscopie, un outil de routine dans le domaine médical	32
3.1.1 Les différents endoscopes	32
3.1.2 Les contrastes classiques de l'endoscopie	33
3.2 L'imagerie optique des tissus couplée à l'endoscopie	36
3.2.1 La microscopie en endoscopie	36
3.2.2 L'OCT en endoscopie	38

3.2.3	Conclusion	41
II	Imagerie par OCT Plein Champ en endoscopie flexible	43
4	Principe d'un OCT Plein Champ à deux interféromètres	45
4.1	Fonctionnement d'un système d'OCT à 2 interféromètres	46
4.1.1	Intérêt d'un montage à 2 interféromètres pour l'endoscopie	46
4.1.2	Signal OCT à 2 interféromètres	47
4.1.3	Détails du montage expérimental de FFOCT	50
4.2	Performances du système	51
4.2.1	Résolutions transversale et axiale	51
4.2.2	Amélioration de la sensibilité	54
4.2.3	Conclusion	54
5	Problématiques et phénomènes optiques d'auto-interférences	57
5.1	Implémentation simple du système	58
5.2	Phénomène de modulation d'intensité	60
5.2.1	Observation d'une image 'fantôme'	60
5.2.2	Interprétation : modulation de phase et d'intensité	60
5.2.3	Solutions possibles	61
5.3	Phénomènes d'auto-interférences	62
5.3.1	Observation d'un signal parasite	62
5.3.2	Interprétation de l'origine du signal par les phénomènes d'auto-interférences	66
5.3.3	Solutions proposées	69
6	Système à endoscope flexible pour l'OCT Plein Champ	75
6.1	Détails du montage et choix des interféromètres	76
6.1.1	Interféromètre contrôleur	76
6.1.2	Montage complet	78
6.2	Dépixélisation de l'image	80
6.2.1	Méthode par filtrage dans l'espace de Fourier	80
6.2.2	Méthode par convolution	80
6.2.3	Méthode par cartographie des coeurs et interpolation	82
6.3	Résultats d'imagerie	85
6.4	Discussion	85
6.4.1	Améliorations à apporter au montage	85
6.4.2	Conclusion	87
III	Imagerie par OCT Plein Champ en endoscopie rigide	89
7	Systèmes à endoscopes rigides pour l'OCT Plein Champ	91
7.1	Système de FFOCT en endoscopie rigide à deux interféromètres	92

7.1.1	Détails du montage	92
7.1.2	Résultats et images	94
7.1.3	Discussion du montage	94
7.2	Système de FFOCT en endoscopie rigide à un interféromètre	96
7.2.1	Détails du montage	96
7.2.2	Imagerie <i>ex vivo</i> avec une sonde aiguille	98
7.2.3	Imagerie <i>in vivo</i> de la peau	100
7.2.4	Ajout du contraste d'élasticité au contraste optique	104
7.2.5	Discussion du montage	107
7.3	Discussion	108
7.3.1	Comparaison des deux approches	108
7.3.2	Conclusion	109
Conclusion et Perspectives		111
A Glossaire des abréviations et notions techniques		115
B Précisions sur le spectre cannelé		119
Références		123

Introduction

Apparue au tournant du XX^{ème} siècle, l'imagerie médicale a profondément changé la pratique de la médecine, améliorant le diagnostic tout en permettant de spectaculaires progrès en recherche biomédicale. Les méthodes d'imagerie cherchent à dépasser le niveau d'information accessible à nos sens, en exploitant pour cela différents phénomènes physiques (magnétisme, radioactivité..) et leurs interactions avec le milieu biologique.

On compte aujourd'hui de multiples techniques, qu'elles soient bien connues du grand public comme l'échographie ultrasonore et la radiographie aux rayons X, ou d'une communauté plus restreinte comme la microscopie confocale et l'imagerie moléculaire. Chacune est basée sur une approche physique spécifique (ondes électromagnétiques ou ultrasonores, radioactivité...) à une échelle donnée, allant du corps entier pour les rayons X, jusqu'à la cellule pour la microscopie confocale.

Parmi ces techniques, l'imagerie optique utilise des ondes électromagnétiques dans une gamme spectrale autour des longueurs d'onde visibles. Elle est donc fondamentalement inoffensive pour les tissus, dans la limite de puissances raisonnables. Un autre intérêt est qu'elle peut atteindre des résolutions de l'ordre de la longueur d'onde, soit du micromètre, ce qui en fait une imagerie microscopique précieuse aux échelles cellulaires. La principale problématique dans le domaine optique est que les tissus biologiques interagissent fortement avec la lumière, par absorption et surtout par diffusion, ce qui brouille le signal et limite les profondeurs d'imageries possibles par atténuation de la puissance lumineuse disponible. Le défi est donc d'obtenir une image à travers le tissu biologique qui est un véritable brouillard.

Il existe différentes stratégies élaborées vis-à-vis de ces phénomènes. On peut choisir d'imager les photons diffusés, qui ont perdu l'information sur leur trajectoire mais qui sont encore présents à des profondeurs de l'ordre du centimètre, ou les photons balistiques, qui gardent une information précise à des profondeurs en général inférieures au millimètre.

Nous nous intéressons ici à la Tomographie de Cohérence Optique, dite OCT, qui image les photons en régime balistique par une technique d'interférométrie en lumière blanche. En pratique, l'OCT peut être décrite comme une échographie optique qui réalise des coupes virtuelles du milieu comme l'échographie ultrasonore, mais à l'échelle micrométrique. Elle permet notamment de distinguer les couches cellulaires de la rétine depuis

l'extérieur de l'oeil, ce qui en fait un outil incontournable en ophtalmologie depuis son apparition dans les années 1990.

L'approche dite Plein Champ, à très haute résolution, accomplit de véritables biopsies optiques des tissus, sans aucuns colorants ni agents de contraste, et permet le diagnostic *ex vivo* de pathologies tissulaires comme les tumeurs. Nous désirons faire avancer cette technologie vers un usage *in vivo* qui aurait de multiples applications dans le domaine clinique pour le guidage de biopsies et le guidage du geste chirurgical en par-opératoire, mais aussi dans le domaine de la recherche pour l'imagerie du petit animal. Comme la profondeur d'imagerie de l'OCT est limitée au millimètre, il n'est pas possible d'imager *in vivo* les organes internes sans disposer d'un endoscope. C'est avec une sonde flexible ou rigide, reliée au système d'imagerie, que l'on pourra inspecter l'organe *in situ* avec le minimum d'invasivité.

L'objectif de cette thèse est donc de proposer des adaptations de l'OCT Plein Champ pour l'endoscopie biomédicale, ce qui n'avait pas encore été réalisé.

Nous introduirons, dans une première partie, les problématiques de l'imagerie optique des tissus (chapitre 1), avant d'exposer les techniques d'imagerie existantes, en particulier l'OCT (chapitre 2), et de présenter l'état de l'art en microscopie endoscopique (chapitre 3).

Dans une deuxième partie, nous donnerons une description détaillée d'un système d'OCT Plein Champ avec endoscope flexible par fibres optiques (chapitres 4, 5, 6) et en proposerons une réalisation.

Enfin, nous présenterons les appareils d'imagerie adaptés à l'endoscopie rigide que nous avons également conçus et développés (chapitre 7).

Première partie

Imagerie optique biomédicale et endoscopie des tissus biologiques

CHAPITRE 1

Problématiques du transport de la lumière dans des milieux biologiques

Table des matières

1.1	L'absorption de la lumière par les tissus	4
1.1.1	Le phénomène d'absorption	4
1.1.2	La fenêtre thérapeutique optique	4
1.2	La diffusion de la lumière par les tissus	5
1.2.1	Le phénomène de diffusion	5
1.2.2	Paramètres de diffusion des tissus biologiques	6
1.3	L'atténuation du signal optique en profondeur	7
1.3.1	L'extinction exponentielle du signal	7
1.3.2	Conclusion sur les stratégies d'imagerie possibles	8

Les milieux biologiques sont des milieux hétérogènes majoritairement composés d'eau qui baigne les structures complexes que sont notamment les noyaux, les organelles et membranes des cellules, ou encore les fibres et fibrilles. Les tissus interagissent donc avec la lumière via deux phénomènes : l'absorption par les molécules biologiques et la diffusion par les microstructures. Ces interactions, toutes deux fortement dépendantes de la longueur d'onde, modifient la propagation de la lumière en profondeur et posent les principales problématiques de l'imagerie optique des tissus. Nous allons présenter brièvement ces phénomènes et discuter leurs conséquences pour l'imagerie.

1.1 L'absorption de la lumière par les tissus

1.1.1 Le phénomène d'absorption

Une molécule peut absorber un photon lorsque l'énergie de celui-ci correspond à une de ses énergies de transition. La molécule transforme alors principalement cette énergie en chaleur, mais elle peut aussi réémettre un photon (fluorescence) ou être le siège d'une réaction photochimique (photosynthèse). Si on considère un flux de photons à différentes énergies $\phi(\lambda)$ qui traverse un milieu absorbant suivant l'axe z , il est atténué de manière exponentielle selon la loi de Beer-Lambert :

$$\phi(\lambda) = \phi_0(\lambda) \exp(-\mu_a(\lambda) z) \quad (1.1)$$

On introduit ici le **coefficient d'absorption** $\mu_a(\lambda)$ (en cm^{-1}). Son inverse est le **libre parcours moyen d'absorption** l_a (en cm) qui caractérise l'absorption d'un milieu à une longueur d'onde donnée.

1.1.2 La fenêtre thérapeutique optique

Parmi les biomolécules responsables de l'absorption, on trouve en première place l'eau qui en est le composant majoritaire. Chez les végétaux, la chlorophylle joue aussi un rôle prépondérant ; cependant ici nous nous intéressons aux tissus animaux et ce sont surtout l'hémoglobine (Hb et sous sa forme oxygénée HbO_2), la mélanine, certaines protéines et le collagène qui participent à l'absorption [1]. Les différents spectres de ces molécules sont représentés sur la figure 1.1. Dans le domaine ultraviolet et infrarouge, c'est l'eau qui est le principal absorbant, tandis que dans le visible et proche infrarouge ce sont les biomolécules.

On remarque qu'entre 0.6 et 1.3 μm l'absorption est moindre, sur la peau par exemple le libre parcours moyen d'absorption l_a est de l'ordre de 1 cm [2]. Pour l'imagerie des

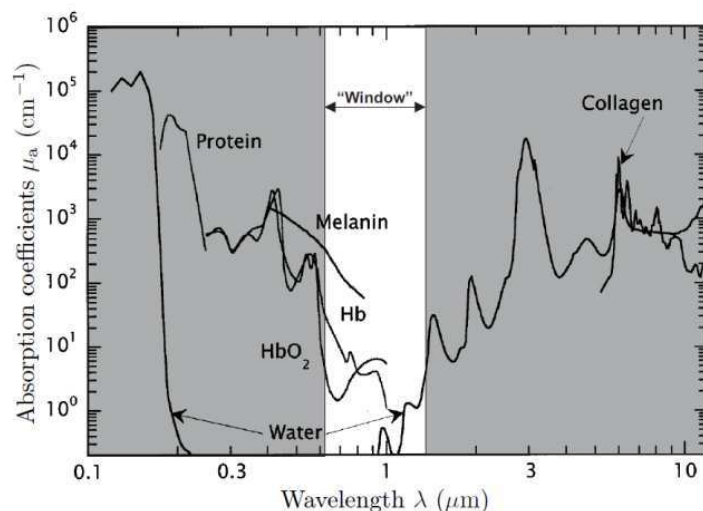


Figure 1.1 – Coefficient d'absorption des principales molécules biologiques en fonction de la longueur d'onde. D'après [3].

tissus on se placera donc préférentiellement dans cette zone, que l'on appelle la fenêtre thérapeutique optique.

1.2 La diffusion de la lumière par les tissus

1.2.1 Le phénomène de diffusion

Lorsqu'un flux de photons illumine un tissu biologique, on peut dire de façon phénoménologique que certains photons traversent le tissu sans être perturbés tandis que d'autres sont diffusés par les particules rencontrées. Le rayonnement de diffusion correspond au rayonnement ré-émis par la particule quand elle reçoit une onde incidente, il se fait à la même longueur d'onde dans le cas ici de la diffusion élastique qui est sans perte d'énergie.

Les caractéristiques de la particule en terme de composition, d'indice de réfraction, de forme, de taille, notamment par rapport à la longueur d'onde λ , conditionnent les caractéristiques du rayonnement diffusé [4].

L'intensité du rayonnement diffusé varie par exemple en fonction de la longueur d'onde comme $I \sim 1/\lambda^4$, pour les petites particules.

En régime de Rayleigh, quand la particule est petite devant λ , le rayonnement est isotrope. Au contraire en régime de Mie, quand la particule est de l'ordre de λ , le rayonnement est anisotrope (aux effets de polarisation près).

La probabilité pour un photon, dont la direction incidente est représentée par le vecteur \vec{k} , de repartir dans une direction \vec{k}' , est donnée par la fonction de phase $f(\vec{k}, \vec{k}')$. Dans un milieu décrit à l'échelle macroscopique comme homogène et isotrope, la fonction de phase ne dépend que de l'angle entre \vec{k} et \vec{k}' . On peut alors définir la fonction de phase en fonction du cosinus de l'angle θ de diffusion tel que $\cos \theta = \vec{k} \cdot \vec{k}'$. Le **coefficient**

d'anisotropie g est alors défini comme le cosinus moyen de l'angle de rediffusion :

$$g = \langle \cos \theta \rangle = \int_{-1}^1 f(\cos \theta) d \cos \theta \quad (1.2)$$

Ce paramètre caractérise l'anisotropie du diagramme de diffusion, il varie entre 0 (diffusion isotrope) et 1 (diffusion vers l'avant).

1.2.2 Paramètres de diffusion des tissus biologiques

Les structures diffusantes des tissus biologiques sont de formes et de tailles variées et trop complexes pour pouvoir directement appliquer une théorie comme celle de Rayleigh ou celle de Mie. On trouve en effet des structures allant en ordres de grandeur de $10^{-1} \mu\text{m}$, comme les membranes ou les fibres de collagènes, jusqu'à $10 \mu\text{m}$, les noyaux et cellules, en passant par $1 \mu\text{m}$, les organelles. On caractérise donc plutôt le tissu à l'échelle macroscopique par un **coefficient de diffusion** $\mu_s(\lambda)$ (en cm^{-1})¹, analogue au $\mu_a(\lambda)$ défini pour l'absorption. On a ainsi dans un cas de diffusion pure une atténuation exponentielle du flux incident balistique ϕ_0 suivant la loi :

$$\phi(\lambda) = \phi_0(\lambda) \exp(-\mu_s(\lambda)z) \quad (1.3)$$

Le **libre parcours moyen de diffusion** l_s (en cm) est l'inverse de μ_s , il peut être interprété comme la distance moyenne entre deux événements de diffusion successifs. Dans les tissus biologiques, il varie en général entre 50 et 200 μm [5], exception faite de cas particuliers comme l'oeil, qui est bien sûr transparent dans sa partie antérieure. Le **facteur d'anisotropie g** varie lui entre 0.8 et 0.98 [5], ce qui correspond à une diffusion préférentiellement vers l'avant.

Le libre parcours moyen de diffusion permet de définir le régime de diffusion dans lequel on se trouve. Pour un milieu d'épaisseur L :

- $L \ll l_s$: régime *balistique* (très peu de diffusion).
- $L \simeq l_s$: régime de *diffusion simple*.
- $L \gg l_s$: régime de *diffusion multiple*.

La figure 1.2 permet d'observer les différents types de trajectoire des photons suivant les événements de diffusion subis. Les photons les plus rapides à traverser le milieu sont les photons **balistiques**, ils n'ont pas subi de diffusion et se sont propagés en ligne droite. Ensuite viennent les photons **serpentiles**, qui ont connu peu d'événements de diffusion et n'ont que peu dévié de la direction de propagation incidente. Enfin on trouve les photons **multidiffusés** qui ont subi plusieurs diffusions et sortent du milieu en ayant perdu l'information de leur direction de départ. Certains photons ne traversent pas totalement le milieu, ils sont **rétrodiffusés** vers le flux incident suite à une ou plusieurs diffusions.

1. On choisit ici d'utiliser comme souvent l'abréviation μ_s et non μ_d , le 's' correspondant au terme anglais 'scattering'. En effet en français le terme diffusion est ambivalent : il peut désigner la diffusion d'une onde par une particule, au sens 'scattering', ou il peut désigner la diffusion qui est celle de la chaleur dans un solide, au sens 'diffusion'. L'utilisation des termes anglais permet ici de lever toute ambiguïté.

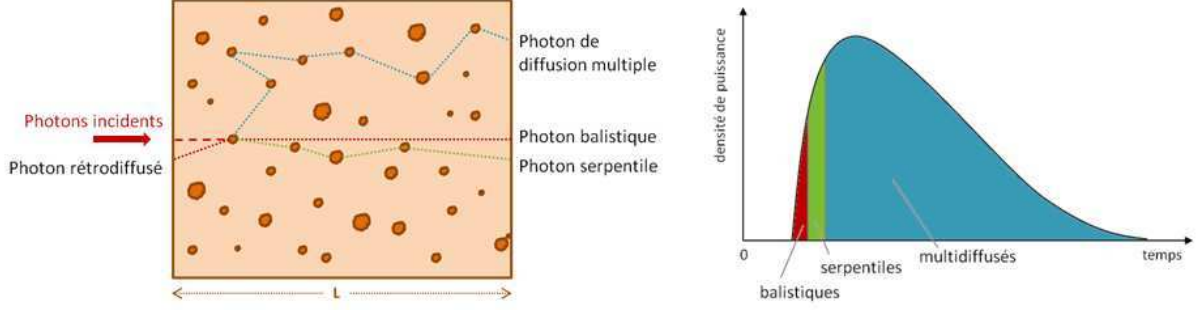


Figure 1.2 – Trajectoires des photons dans un milieu diffusant, répartition des photons par régime de diffusion.

A partir des grandeurs μ_s et g on a alors envie d'introduire un coefficient de diffusion réduit $\mu'_s = \mu_s(1 - g)$. Son inverse $l^* = l_s/(1 - g)$ est le **libre parcours moyen de transport** qui caractérise le trajet optique nécessaire à un photon pour perdre l'information sur sa direction de propagation initiale. Ce concept est pertinent pour décrire les milieux à diffusion fortement anisotrope, il est illustré sur la figure 1.3. Pour les tissus où $g \simeq 0.9$, on obtient $l^* \simeq 10 l_s$ soit un libre parcours moyen de transport entre 0.5 et 2 mm.

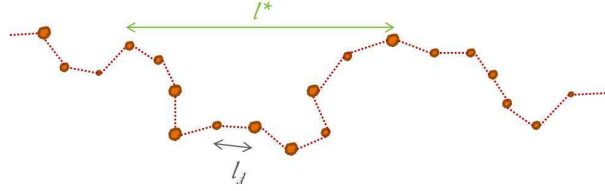


Figure 1.3 – Trajectoire d'un photon dans un milieu à diffusion fortement anisotrope.

1.3 L'atténuation du signal optique en profondeur

1.3.1 L'extinction exponentielle du signal

On a vu que les deux phénomènes d'absorption et de diffusion participent à l'atténuation du signal. On peut rassembler ces deux contributions dans le **coefficient d'extinction** $\mu_e = \mu_s + \mu_a$ de manière à ce que la lumière balistique (dans la direction incidente z) s'atténue exponentiellement comme :

$$\phi_z(\lambda) = \phi_0(\lambda) \exp(-\mu_e(\lambda) z) \quad (1.4)$$

Selon les tissus on a $\mu_s \simeq 50$ à 200 cm^{-1} et $\mu_a \simeq 0.1$ à 10 cm^{-1} ; c'est donc la diffusion qui est majoritairement à l'origine de l'extinction du signal, avec $\mu_e \simeq \mu_s \simeq 50$ à 200 cm^{-1} et donc $l^* = 0.5$ à 2 mm . Cela signifie que par exemple sur une épaisseur l^* , soit 1 mm, le signal balistique transmis est déjà divisé d'un facteur 10^4 ; et sur $10 l^*$, soit 1 cm, de 10^{43} !

Lorsque la lumière balistique est éteinte, pour $L \gg l^*$, il reste cependant le signal

diffusé. C'est alors le **coefficient d'extinction effectif** μ_{eff} [6] qui caractérise l'extinction exponentielle du signal total selon :

$$\phi_{\text{total}}(\lambda) = \phi_0(\lambda) \exp(-\mu_{\text{eff}}(\lambda) L) \quad \text{avec} \quad \mu_{\text{eff}} = \sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu'_s)} \quad (1.5)$$

On voit ici que l'absorption est en quelque sorte amplifiée par la diffusion qui allonge les trajets des photons dans le milieu. Suivant les tissus, on obtient typiquement μ_{eff} entre 2 et 50 cm^{-1} . Ainsi sur une épaisseur $10 l^*$, soit 1 cm, le signal diffus est divisé d'un facteur 10^2 ; et sur $100 l^*$, soit 10 cm, de 10^{21} !

Cette extinction est bien sûr dépendante de la longueur d'onde; au final ce sont les longueurs d'onde dans le rouge et le proche infrarouge qui sont le moins atténuées. On peut en faire simplement l'expérience en plaçant sa main sur une lampe de poche blanche, et en constatant que c'est la lumière rouge qui la traverse (figure 1.4).

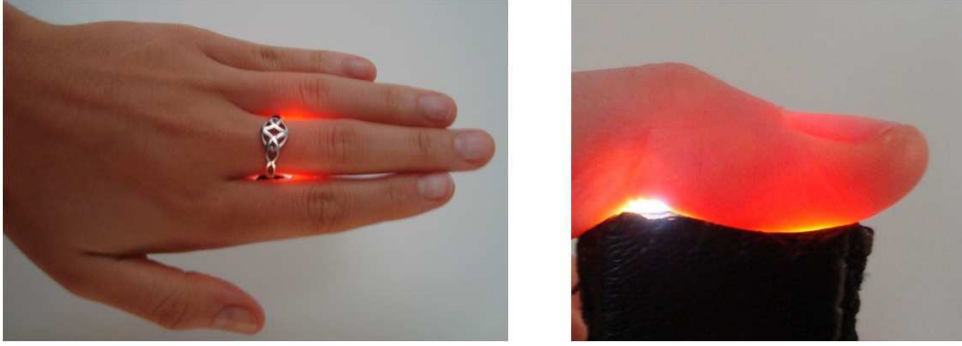


Figure 1.4 – Main éclairée par une lumière blanche.

1.3.2 Conclusion sur les stratégies d'imagerie possibles

Il y a donc deux possibilités pour imager les tissus :

Imagerie des photons balistiques. Ces photons transportent directement une information bien résolue spatialement sur le milieu, l'imagerie est donc haute-résolution mais limitée en profondeur à typiquement 1 mm.

Imagerie des photons diffusés et multi-diffusés. Ces photons ont perdu la mémoire de leur direction de propagation initiale, il faut donc reconstituer l'information. Mais il y a plus de photons disponibles, ce qui permet d'atteindre des profondeurs d'imagerie plus grandes, jusqu'à 10 cm.

CHAPITRE 2

Différentes approches d'imagerie optique dans les milieux diffusants

Table des matières

2.1	Imagerie des photons multidiffusés	10
2.1.1	Imagerie optique des photons multidiffusés	10
2.1.2	Imagerie multimodale des photons multidiffusés	11
	Imagerie photo-acoustique	11
	Imagerie acousto-optique	12
2.1.3	Conclusion	12
2.2	Imagerie des photons balistiques	13
2.2.1	Notions essentielles de microscopie classique	14
2.2.2	Filtrage spatial	15
	Microscopie confocale	15
	Microscopie en illumination structurée	16
	Microscopie de fluorescence à deux photons	17
2.2.3	Filtrage temporel	18
	Filtrage par porte temporelle	18
	Filtrage par cohérence temporelle	19
2.3	Imagerie par OCT : la Tomographie de Cohérence Optique	20
2.3.1	Principes généraux de l'OCT	20
2.3.2	L'approche OCT Plein Champ	23
2.3.3	Conclusion	28

L'extinction exponentielle du signal avec la profondeur est la limitation principale de l'imagerie optique dans les tissus. Nous avons vu qu'il y a deux grandes stratégies possibles suivant le type de photon que l'on choisit de détecter. Nous allons présenter ici rapidement les techniques d'imagerie en régime de diffusion multiple, qu'elles soient purement optiques ou multimodales, puis en régime balistique ou pseudo-balistique, pour nous intéresser enfin plus en détail à la Tomographie de Cohérence Optique (OCT) qui fait l'objet de cette thèse. Le but n'est pas ici d'effectuer un état de l'art exhaustif de toutes les méthodes (pour cela nous renvoyons par exemple à la revue de C. Dunsby et P. French [7]), mais plutôt de présenter les principales idées derrière les méthodes les plus courantes en imagerie biomédicale afin de mieux comprendre la spécificité de l'OCT, son intérêt et ses limites.

2.1 Imagerie des photons multidiffusés

Comme expliqué au chapitre 1, l'intérêt de travailler en régime multidiffusif est que le signal diffus est atténué moins rapidement que le balistique, et l'on peut donc pénétrer bien plus profondément dans le tissu. En terme d'ordre de grandeur on peut ainsi viser des applications en imagerie d'organes entiers, le sein par exemple, ou encore le cerveau. La principale difficulté est ici la localisation de l'information : contrairement aux photons balistiques, les photons multidiffusés ont perdu toute mémoire de leur trajectoire complexe.

2.1.1 Imagerie optique des photons multidiffusés

La principale technique purement optique est la **Tomographie Optique Diffuse** (DOT) [8]. L'idée est d'utiliser un ensemble de sources, situées spectralement dans le proche infrarouge, et un ensemble de détecteurs qui recueillent la lumière diffuse transmise en différents points de la surface de l'objet. Différentes configurations sont possibles : en transmission, en rétrodiffusion, ou encore en schéma circulaire (sources et détecteurs alternés en anneau autour de l'objet). A partir des données enregistrées on utilise des modèles de diffusion de la lumière dans le milieu pour reconstruire les propriétés optiques à l'intérieur de l'objet (typiquement μ_a et μ'_s). La résolution spatiale dépend de la profondeur de l'objet et de la finesse de l'échantillonnage, c'est-à-dire du nombre de sources et de détecteurs, cependant plus ce nombre est élevé plus la résolution du problème inverse est complexe et gourmand en temps de calcul. On peut obtenir des résolutions de l'ordre de 10 mm à 5 cm de profondeur [9]. La résolution n'est donc pas aussi bonne qu'en IRM ou en échographie par exemple, mais la DOT apporte un autre contraste, notamment

fonctionnel. Ainsi les principales applications à ce jour sont l'imagerie fonctionnelle du cerveau [10] [11] (voir figure 2.1) et l'étude de tumeurs du sein [12].

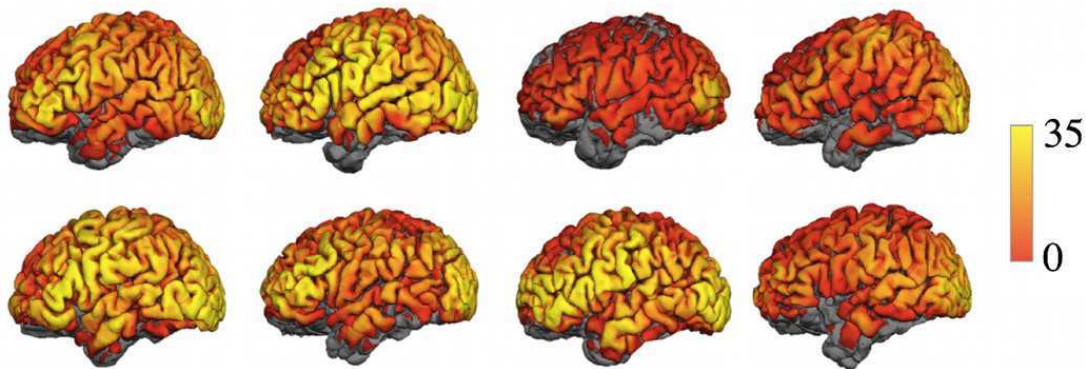


Figure 2.1 – Images de Tomographie Optique Diffuse *in vivo* sur 8 cerveaux humains, en échelle de rapport contraste-sur-bruit. D'après [11].

2.1.2 Imagerie multimodale des photons multidiffusés

En général, le principe de l'imagerie multimodale est de combiner les propriétés de plusieurs ondes afin de tirer profit des avantages de chacune. Une combinaison très répandue est l'association entre optique et acoustique. En effet les ultrasons, utilisés en routine médicale pour l'échographie, sont bien moins atténués que la lumière dans les tissus, c'est d'ailleurs ce qui permet à l'échographie de conserver une résolution millimétrique à travers les organes. L'idée ici est d'utiliser la grande profondeur d'imagerie des ondes ultrasonores, tout en essayant de garder l'information apportée par les ondes optiques. Cela se fait via deux méthodes, la photo-acoustique et l'acousto-optique.

Imagerie photo-acoustique

L'effet photo-acoustique (ou opto-acoustique) est connu depuis 1880 [13]. Lorsqu'une onde électromagnétique instationnaire illumine un échantillon, gazeux, liquide ou solide, elle est en partie absorbée par le milieu et produit de la chaleur. Cette chaleur provoque une dilatation du milieu, ce qui crée alors des ondes acoustiques qui se propagent à partir des zones d'absorption. En détectant ces ondes acoustiques par une matrice de transducteurs ultrasonores on peut localiser l'objet absorbant : par une détection acoustique on mesure ainsi un contraste optique.

L'illumination se fait généralement par un laser de grande puissance crête et la détection se fait en général du même côté que l'illumination. En imagerie biomédicale on peut utiliser par exemple comme contraste intrinsèque l'absorption de l'hémoglobine, ou on peut ajouter des marqueurs fonctionnalisés comme des molécules organiques ou des nanoparticules d'or. Cette technique déjà très avancée est utilisée *in vivo* à différentes échelles, et donne théoriquement une résolution pouvant atteindre environ $1/200$ de la profondeur [14] (figure 2.2). Pour une profondeur de 1 mm on peut obtenir une résolution de $30 \mu\text{m}$ [15], et pour une profondeur de $100 \mu\text{m}$ une résolution de 220 nm (figure 2.2 A) [14], de telle sorte que l'on parle même de microscopie photo-acoustique.

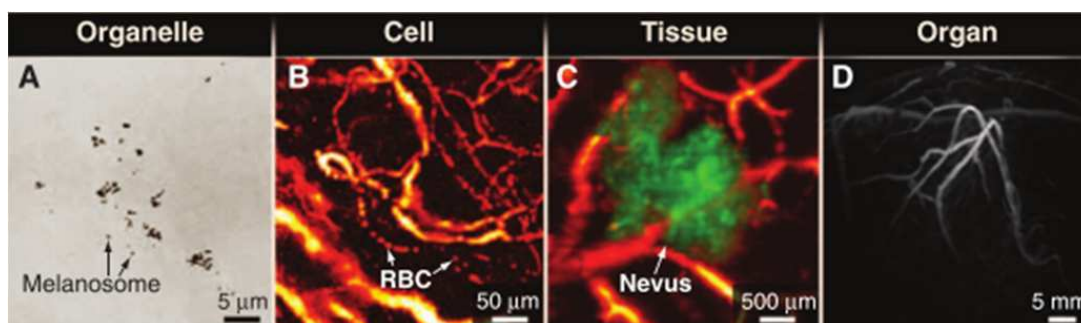


Figure 2.2 – Tomographie et Microscopie photo-acoustique *in vivo* à différentes échelles : (A) Mélanosomes dans une oreille de souris. (B) Globules rouges circulant dans un capillaire d'une oreille de souris. (C) Nevus sur un avant-bras humain. (D) Sein humain. D'après [14].

Imagerie acousto-optique

Le principe de l'imagerie acousto-optique est beaucoup plus récent, il a été breveté en 1989 par D. Dolfi et F. Micheron [16]. En acousto-optique, contrairement à la photo-acoustique, on utilise une détection optique, en transmission ou en rétrodiffusion. L'objet est illuminé par une source optique cohérente, généralement un laser, pour obtenir une figure de speckle (voir annexe A) en sortie du milieu. On utilise un faisceau ultrasonore focalisé pour marquer les photons en une zone connue. En effet, les structures diffusantes situées dans la zone de focalisation des ultrasons sont à la fois comprimées et mises en mouvement par l'onde de pression, ce qui induit localement une modulation des chemins optiques, et en sortie une modulation de l'intensité lumineuse. La détection de cette modulation donne accès à l'amplitude de la lumière provenant de la zone de focalisation des ultrasons, amplitude qui est elle-même liée à l'absorption optique de l'objet. En balayant le faisceau ultrasonore dans l'objet comme pour une échographie on peut ainsi cartographier les propriétés d'absorption optique du milieu (figure 2.3). La résolution obtenue est de 1 mm jusqu'à plus de 5 cm de profondeur. La motivation essentielle de ces travaux est la détection du cancer du sein à un stade précoce. Cependant l'application *in vivo* pose des problèmes à cause des mouvements du patient qui entraînent une décorrélation rapide de la figure de speckle. Pour une étude détaillée nous renvoyons à la thèse de Salma Farahi [17].

2.1.3 Conclusion

Les techniques d'imagerie en régime multidiffusif permettent d'imager jusqu'à 10 cm de profondeur maximum, ce qui est un avantage considérable pour imager des organes entiers, cependant la résolution est alors d'au mieux 1 mm. Si l'on veut améliorer cette résolution pour aller vers des applications de microscopie, on est néanmoins obligé de réduire la profondeur d'imagerie jusqu'au millimètre. On atteint alors une gamme de profondeurs pour lesquelles il est préférable en termes de résolution d'utiliser la lumière balistique.

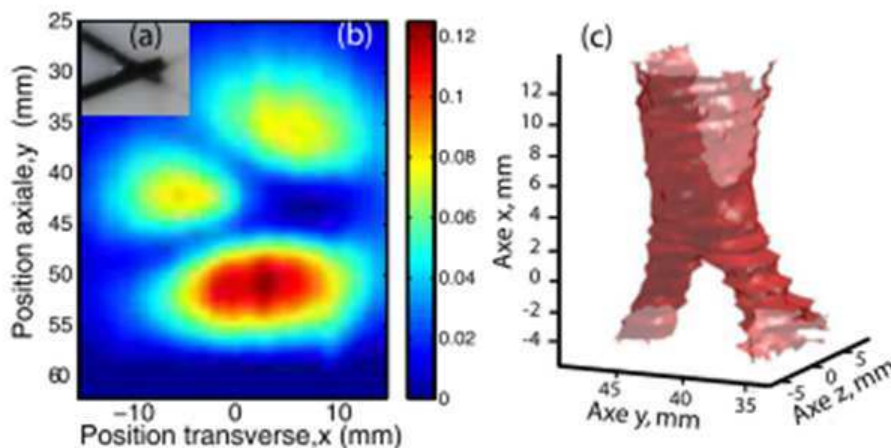


Figure 2.3 – Imagerie acousto-optique d’un objet absorbant en trois dimensions. (a) Image acousto-optique en deux dimensions et photographie de l’objet absorbant, plan de coupe (x,y). (b) Image acousto-optique en trois dimensions. D’après [17].

2.2 Imagerie des photons balistiques

L’imagerie en lumière balistique est une imagerie classique dans la mesure où les photons vérifient les lois de l’optique géométrique. On connaît donc la trajectoire de chaque photon en sortie de l’objet et on peut localiser l’information voulue avec une résolution limitée par la diffraction. Comme nous l’avons vu, l’extinction du signal étant trop importante après 1 mm, on restera donc limité à l’imagerie de surface.

Il serait d’autre part difficile de travailler en transmission sur de si faibles épaisseurs si l’on envisage des applications *in vivo*, aussi travaillera-t-on souvent en rétrodiffusion. Les photons détectés ne sont alors plus strictement balistiques : ce sont les photons qui ont subi une seule diffusion vers l’arrière, ce qui est équivalent à une réflexion en optique géométrique. Dans la suite, on les qualifiera cependant par extension de balistiques.

On peut également travailler avec la fluorescence, qui est un outil d’imagerie extrêmement important dans le domaine biomédical. Lorsqu’une molécule est excitée suite à l’absorption d’un photon (venant par exemple d’un rayonnement laser), il peut y avoir fluorescence, c’est-à-dire l’émission spontanée d’un photon, à une énergie en général légèrement inférieure (soit une longueur d’onde supérieure). On peut reconnaître chaque molécule fluorescente, appelée fluorophore, par ses spectres d’excitation et d’émission caractéristiques. En illuminant l’objet à une longueur d’onde connue et en séparant la lumière émise en fonction de sa longueur d’onde, on est capable de ne sélectionner que le signal venant d’un fluorophore donné. Cependant ce signal n’est pas discriminé spatialement, il y a superposition des signaux venant des différentes profondeurs, ce qui brouille rapidement le signal.

Nous allons présenter différentes techniques axées sur la microscopie qui ont pour objectif de filtrer les photons balistiques ou de rejeter les photons diffusés, que ce soit en détection d’un signal de rétrodiffusion ou de fluorescence, et qui permettent également d’effectuer une coupe optique dans le milieu, pour obtenir une image 3D.

2.2.1 Notions essentielles de microscopie classique

Pour la suite nous rappellerons quelques notions de microscopie. Un microscope classique focalise la lumière d'un faisceau collimaté à l'aide d'un objectif de microscope, qui est un assemblage complexe de lentilles.

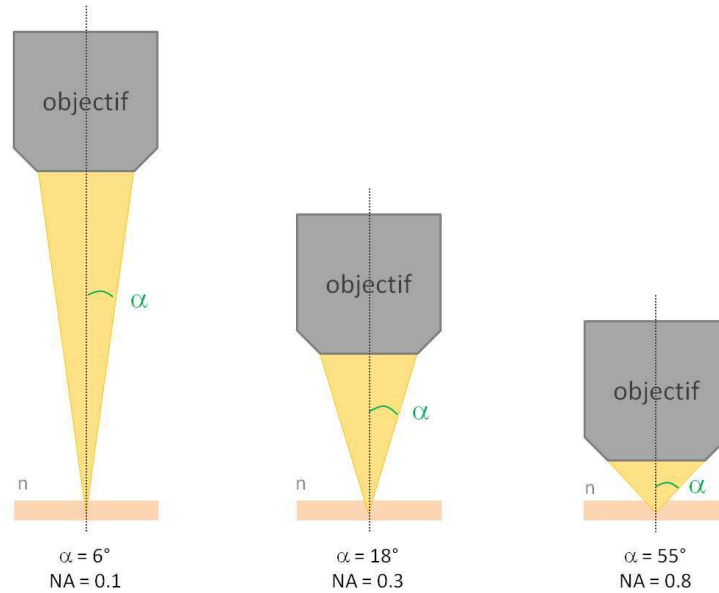


Figure 2.4 – Définition de l'ouverture numérique (NA) d'un objectif de microscope.

L'**ouverture numérique** (NA pour Numerical Aperture) d'un objectif caractérise l'ouverture du cône de lumière, illustré sur la figure 2.4. Dans un milieu d'indice de réfraction n , si on appelle α le demi-angle du cône d'illumination :

$$NA = n \sin \alpha \quad (2.1)$$

Plus l'ouverture numérique est élevée, meilleure est la **résolution transversale** de l'objectif. En effet, une grande ouverture numérique permet de recueillir les rayons les plus inclinés, qui portent l'information la plus fine sur l'objet. A la longueur d'onde λ , pour un système sans aberrations, la résolution transversale R_0 d'un faisceau collimaté au plan focal est donnée par le critère de Rayleigh :

$$R_0 = 1.22 \frac{\lambda}{2 NA} \quad (2.2)$$

Lorsque l'on s'éloigne du plan focal, la résolution se dégrade. La **profondeur de champ** représente la distance, de part et d'autre du plan focal, sur laquelle la résolution transversale respecte le critère $R(z) \leq \sqrt{2} R_0$. Avec quelques approximations, la profondeur de champ L_z décroît avec l'ouverture numérique comme illustré sur la figure 2.5 selon :

$$L_z = 1.22 n \frac{\lambda}{NA^2} \quad (2.3)$$

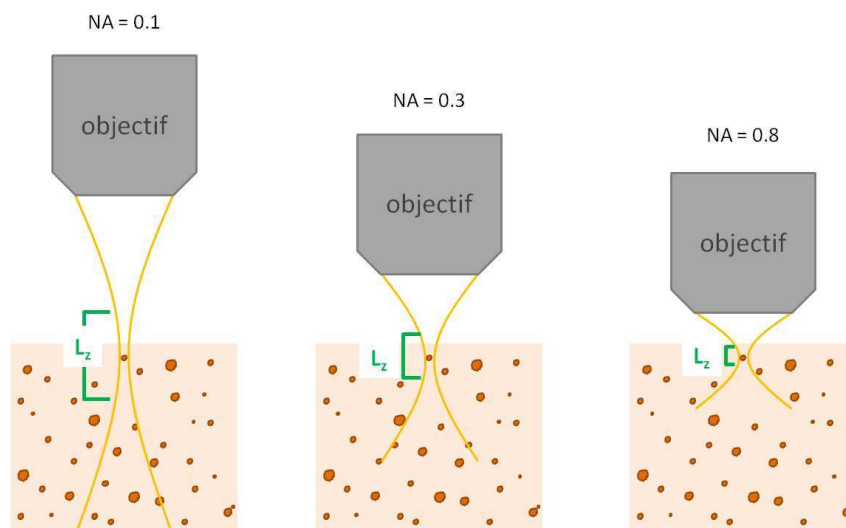


Figure 2.5 – Faisceaux de différentes ouvertures numériques (NA) et profondeurs de champ.

2.2.2 Filtrage spatial

Une observation directe au microscope des tissus étant impossible à cause de la diffusion, une première idée pour résoudre ce problème est de discriminer spatialement la lumière diffusée.

Microscopie confocale

Une méthode largement répandue dans les laboratoires de biologie est la microscopie confocale, qui peut se faire en rétrodiffusion (appelée aussi réflectance) ou en fluorescence. Elle sépare les photons balistiques des autres photons en se basant sur le fait que, contrairement aux photons diffusés, les photons balistiques suivent une trajectoire rectiligne dans le milieu.

Un microscope classique focalise la lumière d'un faisceau collimaté (un laser par exemple) dans le tissu à l'aide d'un objectif, qui refocalise au retour l'image sur un détecteur. L'idée, introduite dans les années 1950 [18], est de placer un petit diaphragme devant le détecteur dans un plan conjugué du plan focal, de telle manière que la lumière venant des plans hors focalisation est arrêtée comme on peut le voir sur la figure 2.6. De plus, la lumière diffusée sortant de l'échantillon avec des angles quelconques n'est pas focalisée sur le diaphragme et est donc rejetée. Classiquement la zone de focalisation est balayée point-par-point par le laser d'illumination pour reconstruire une image microscopique dans les trois dimensions. Des méthodes plus récentes permettent de réduire le balayage à seulement 2 dimensions en focalisant le laser sur une ligne au lieu d'un point [19].

La profondeur d'imagerie est limitée entre 50 et 200 μm selon les tissus. La résolution axiale correspond à ce qu'on pourrait appeler paradoxalement l'épaisseur du plan focal, c'est-à-dire la profondeur de champ de l'objectif utilisé comme expliqué précédemment en 2.2.1. Comme illustré sur la figure 2.5, pour avoir une petite profondeur de champ il faut utiliser une grande ouverture numérique, typiquement supérieure à 0.8, ce qui donne une section de l'ordre de 2 μm . La résolution transversale est sensiblement celle de l'objectif

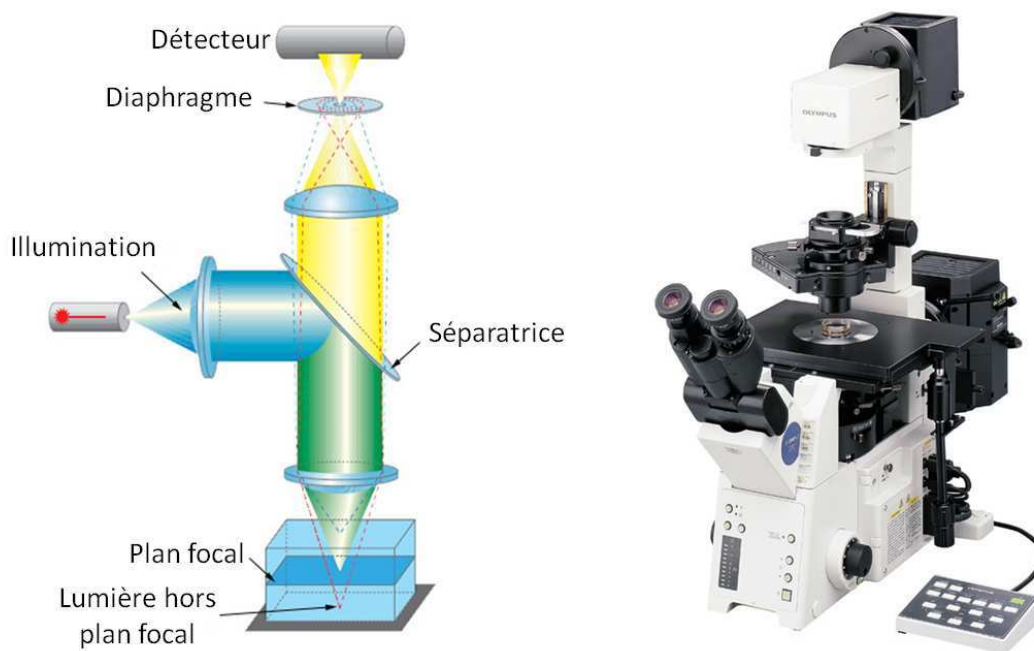


Figure 2.6 – Principe de la microscopie confocale et exemple de microscope confocal commercial (Olympus IX81).

de microscope, elle est alors typiquement inférieure à $1\ \mu\text{m}$. Les résolutions axiale et transversale sont ici corrélées et déterminées par l'ouverture numérique de l'objectif.

En mode de détection de réflectance la microscopie confocale apporte un contraste optique intrinsèque, correspondant aux hétérogénéités d'indices de réfraction dans l'échantillon, ce qui apporte une information morphologique. En mode fluorescence, endogène ou exogène, c'est un contraste plus fonctionnel. Aussi est-elle largement répandue aujourd'hui en recherche biomédicale pour imager des tissus végétaux et animaux, ou des cellules isolées. Plusieurs études ont par ailleurs déjà été réalisées pour évaluer son potentiel clinique *ex vivo* et *in vivo*, notamment sur la peau [20] [21] [22].

Microscopie en illumination structurée

La microscopie en illumination structurée (SIM) est une technique d'imagerie plein champ (sans balayage xy) qui effectue une coupe optique axiale fine, inférieure au micromètre, en temps réel [23]. Elle fonctionne en mode de fluorescence ou de réflectance.

Pour cela l'objet est éclairé par un faisceau d'excitation structuré spatialement, souvent par une grille 1D ou 2D. La modulation spatiale de l'excitation au niveau du plan focal objet module le signal émis uniquement dans le plan focal image, puis par combinaison et reconstruction informatique d'isoler uniquement le signal venant du plan focal. De plus, en mode de fluorescence l'utilisation de grilles à hautes fréquences permet de recueillir des informations fines sur l'échantillon et d'améliorer la résolution transversale d'un facteur 2 par rapport à un microscope classique, pour atteindre des résolutions de l'ordre de 100 nm [24].

La figure 2.7 montre des images d'un même échantillon obtenues avec un microscope conventionnel, confocal, et à illumination structurée [25].

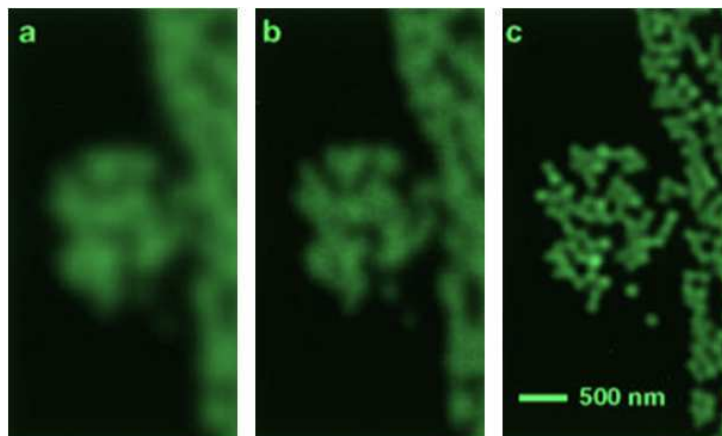


Figure 2.7 – Images de microscopères fluorescentes de diamètre 121 nm obtenues par microscopie classique (a), confocale (b), et à illumination structurée (c). Tiré de [25].

Microscopie de fluorescence à deux photons

Le signal de fluorescence en microscopie conventionnelle est brouillé car il est émis à toutes les profondeurs. Les techniques comme le confocal ou l'illumination structurée sélectionnent une profondeur d'émission dans l'échantillon. À l'inverse, la microscopie à deux photons sélectionne une profondeur d'excitation dans l'échantillon, en se fondant sur le phénomène d'optique non linéaire d'absorption à deux photons. Ce phénomène a été prédit dès 1931 [26], observé pour la première fois 30 ans plus tard [27], et appliqué à la microscopie en 1990 [28].

Il est possible pour une molécule d'absorber simultanément deux photons (ou plus), puis d'émettre un photon de fluorescence correspondant, comme illustré sur la figure 2.8 [29]. Cependant, il faut pour cela que les deux photons interagissent simultanément avec l'atome à exciter dans un laps de temps suffisamment court (10^{-16} s) pour que leurs actions s'additionnent. L'intensité lumineuse doit alors être très grande pour que la probabilité d'un tel événement soit non négligeable. Des impulsions de très courte durée (< 200 fs) fournies par des lasers sophistiqués sont nécessaires afin d'atteindre des intensités suffisantes à l'observation de ce phénomène.

En microscopie à 2 photons (M2P), on focalise donc les impulsions dans un petit volume focal (voir figure 2.9) dans lequel les molécules de l'échantillon absorbent deux photons ayant chacun la moitié de l'énergie (donc le double de la longueur d'onde) nécessaire à leur excitation. Ces molécules réémettent alors généralement un photon par fluorescence. On peut ensuite reconstituer l'image d'un plan xy de l'échantillon en déplaçant le point focal dans ce plan, et on obtient des images 3D en balayant en z . En théorie on peut utiliser la même technique avec 3, 4 ... n photons (Microscopie Multi-Photons, MPM), cependant le niveau d'intensité requis est à chaque fois supérieur et on atteint rapidement les seuils de dommage des tissus.

Comparé aux autres techniques de fluorescence, la M2P garde une résolution transversale $< 1 \mu\text{m}$ en permettant une meilleure résolution axiale $< 1 \mu\text{m}$, mais également une meilleure pénétration, jusqu'à $500 \mu\text{m}$ [30]. En effet la lumière d'excitation a une longueur d'onde double, et est donc moins diffusée, comme on l'a vu au chapitre 1. L'utilisation

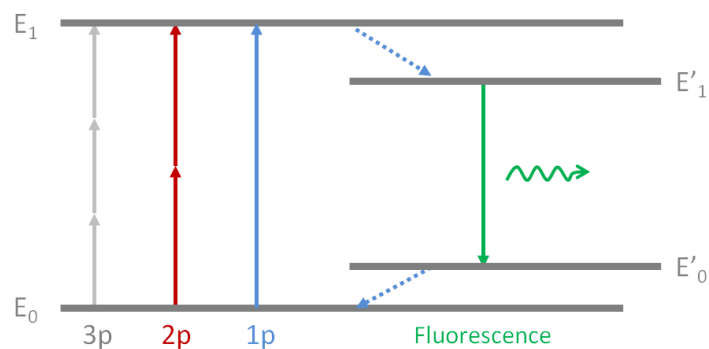


Figure 2.8 – Schématisation des niveaux d'énergie d'une molécule fluorescente. La flèche bleue représente l'absorption à un photon (1p), les flèches rouges représentent l'absorption à 2 photons (2p) et les grises représentent l'absorption à 3 photons (3p). La flèche pointillée représente le passage vers un niveau d'énergie intermédiaire avant l'émission spontanée d'un photon de fluorescence (flèche verte).

d'un faisceau laser intense ($\sim \text{MW cm}^{-2}$ à GW cm^{-2}) peut poser des problèmes de phototoxicité, mais qui ouvrent la voie à la destruction de certaines cellules de manière ciblée [31].

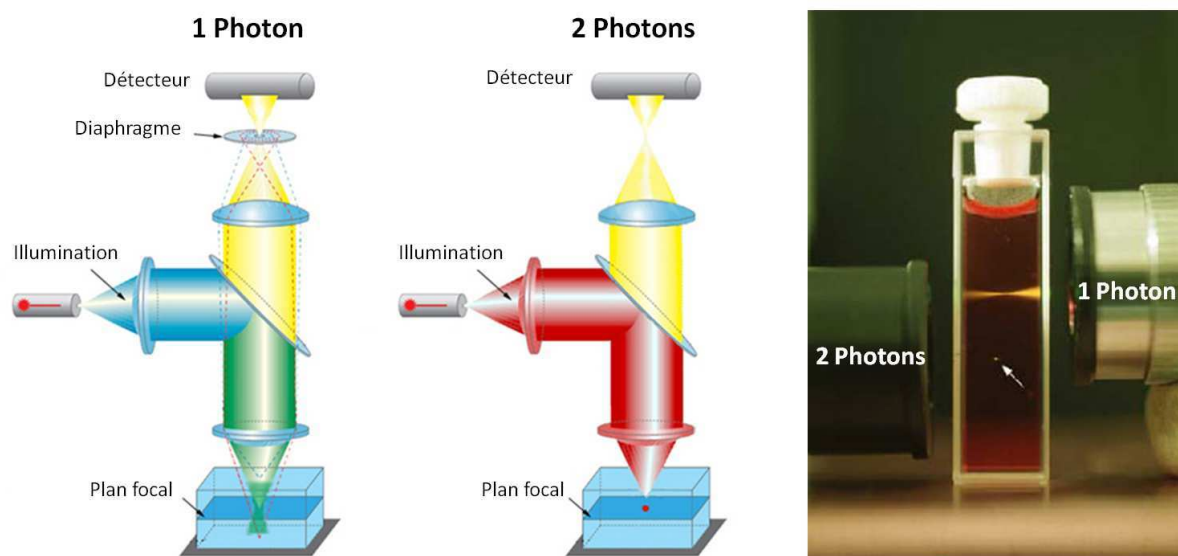


Figure 2.9 – Comparaison des montages de fluorescence à 1 photon (confocal) et à 2 photons, illustration de la localisation de la fluorescence à 2 photons au point focal.

2.2.3 Filtrage temporel

Filtrage par porte temporelle

Les techniques de filtrage temporel utilisent le fait que ce sont les photons balistiques qui sortent en premier du milieu diffusant car leur trajet y est plus court, comme expliqué sur la figure 1.2 page 7.

Le temps de vol des photons peut être mesuré directement en envoyant une impulsion lumineuse très brève dans le milieu, de l'ordre de quelques femtosecondes, et en enregistrant les temps d'arrivée des différents photons. Pour ne détecter que les photons balistiques, il faut réaliser une porte temporelle très étroite, inférieure à 100 fs. La taille de cette fenêtre détermine la résolution d'imagerie ; notons qu'en 10 fs la lumière parcourt environ 2 μm dans les tissus.

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour réaliser ce fenêtrage temporel. Il existe directement des détecteurs ultra-rapides (streak cameras, photodiodes à avalanche...) mais qui sont encore trop lents, plutôt au niveau de la picoseconde [32]. On peut par contre utiliser des phénomènes non-linéaires qui induisent un fenêtrage temporel de l'ordre de l'impulsion laser (effet Kerr [33], génération de second harmonique [34], diffusion Raman stimulée [35]...). Cela nécessite l'utilisation de lasers femtoseconde et souvent de grandes intensités pour induire l'effet non-linéaire, les dispositifs sont souvent chers, ne permettent pas une imagerie rapide (balayage), et la sensibilité reste faible pour une imagerie des tissus.

Filtrage par cohérence temporelle

Les techniques de filtrage par cohérence reposent sur le fait que seule la lumière balistique conserve ses propriétés de cohérence spatiale à la traversée du milieu diffusant, et peut donc interférer avec un faisceau de référence. En détectant les interférences, on sélectionne ainsi uniquement le signal balistique qui a un temps de vol déterminé. Cette idée a été proposée dès 1967 par K. A. Stetson pour imager à travers le brouillard [36].

Holographie L'holographie enregistre les interférences entre l'onde venant de l'objet et une onde de référence sur une caméra ou un matériau photosensible comme un cristal photoréfractif [37]. Ces techniques holographiques sont souvent limitées par le contraste de la figure d'interférence, contraste dégradé par le fond lumineux incohérent. Cela peut être amélioré grâce à une détection hétérodyne en balayant en fréquence l'onde de référence, ou en réalisant un filtrage dans le domaine des fréquences spatiales, mais en perdant alors la capacité de coupe en profondeur [38].

Tomographie de Cohérence Optique Comme la microscopie confocale, la Tomographie de Cohérence Optique (OCT pour Optical Coherence Tomography) permet de sélectionner en profondeur une tranche de tissu en éliminant les photons diffusés provenant des autres couches. Elle peut imager les tissus *in vivo* en temps réel sur typiquement 1 mm de profondeur avec des résolutions de 1 à 20 μm . Nous allons l'étudier en détail dans la partie suivante.

2.3 Imagerie par OCT : la Tomographie de Cohérence Optique

Cette technique récente a été proposée en 1991 par J. G. Fujimoto [39]. Elle a depuis connu un développement rapide dans le domaine biomédical grâce à sa capacité à réaliser des biopsies optiques, c'est-à-dire à visualiser *in situ* et *in vivo* les microstructures des tissus en profondeur sans avoir besoin de prélever ni de traiter l'échantillon [40]. Cela en fait un outil potentiellement révolutionnaire pour les situations cliniques où la biopsie excisionnelle classique est dangereuse voire impossible (oeil, artères) ou sujette à des erreurs d'échantillonnage.

Ainsi dès le milieu des années 1990 un premier appareil clinique a été commercialisé pour l'imagerie en ophtalmologie. En effet l'OCT est capable d'imager à travers l'oeil entier, qui est un organe essentiellement transparent, pour révéler en profondeur les différents couches de la rétine, permettant au médecin d'établir un diagnostic non invasif jusque là impossible. Les examens OCT font maintenant partie de la routine des cabinets d'ophtalmologie de ville.

2.3.1 Principes généraux de l'OCT

L'OCT mesure l'amplitude et le temps de vol des photons balistiques en utilisant la technique très sensible d'interférométrie à faible longueur de cohérence.

Interférométrie à faible longueur de cohérence

L'interférométrie à faible longueur de cohérence, ou interférométrie en lumière blanche, a déjà été décrite par Isaac Newton à la fin du XVII^{ème} siècle [41]. C'est ce phénomène qui est à l'origine des belles couleurs irisées qu'on voit sur les couches minces comme les bulles de savon ou les taches d'essence (voir annexe B). Il a été appliqué pour la première fois en biologie en 1988 pour la mesure de la longueur de l'oeil [42].

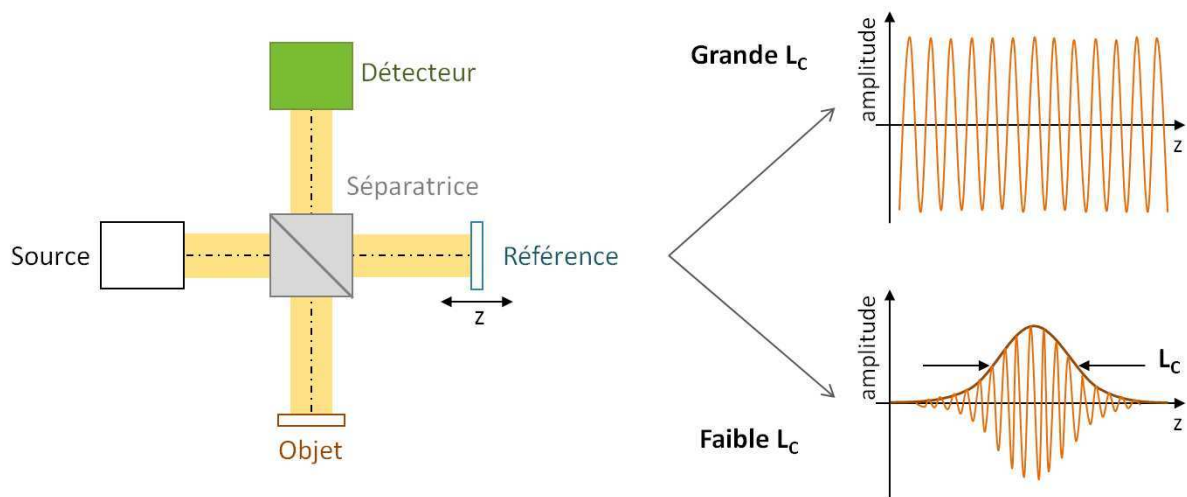


Figure 2.10 – Interféromètre de Michelson : principe de l'interférométrie et longueur de cohérence.

Le principe est présenté sur la figure 2.10, ce montage est appelé interféromètre de Michelson. La lumière venant de la source est divisée en amplitude dans deux bras par une surface séparatrice : le bras objet comprenant l'échantillon, et le bras de référence avec une surface réfléchissante connue. On mesure le temps de vol de la lumière venant de l'échantillon objet, d'amplitude E_{ob} , en la recombinaison avec le faisceau de référence, d'amplitude E_r , dont le temps de vol (la longueur du bras) est connu. Le champ qui arrive sur le détecteur est la somme des deux champs en amplitude : $E_r + E_{ob}$. L'intensité mesurée est :

$$I \sim |E_r|^2 + |E_{ob}|^2 + 2E_r E_{ob} \cos\left(\frac{2\pi}{\lambda} \delta\right) \quad (2.4)$$

où δ est la différence de marche de l'interféromètre (en μm), c'est-à-dire la différence de chemin optique entre les deux bras. L'intensité résultante est la somme des intensités référence $|E_r|^2$ et objet $|E_{ob}|^2$ et d'un terme croisé d'interférence en $E_r E_{ob}$

Cependant le terme d'interférence est modulé par la cohérence : on détecte des interférences avec le bras de référence seulement lorsque le chemin est le même à une longueur de cohérence près, c'est-à-dire $\delta \leq L_c$. La **longueur de cohérence temporelle** L_c est une caractéristique de la source de lumière, elle définit la différence de marche maximum sur laquelle les interférences sont visibles [43]. Les interférences ne sont donc détectées que dans une zone de l'objet appelée volume de cohérence, qui est en réalité un 'plan' d'épaisseur $L_c/2n$, avec n l'indice du milieu. Pour un spectre à profil Gaussien idéal, L_c dépend du spectre de la source selon la formule :

$$L_c = \frac{2 \ln 2}{\pi} \frac{\lambda_0^2}{\Delta\lambda} \quad (2.5)$$

Plus le spectre est large ($\Delta\lambda$ grand), plus la longueur de cohérence est faible. En effet dans un spectre large les systèmes d'interférence dûs à chaque longueur d'onde se superposent et se brouillent, car ils ont chacun une différence de phase $\frac{2\pi}{\lambda} \delta$ différente. En terme d'ordre de grandeur, la lumière du soleil, telle que vue par notre oeil, a une longueur de cohérence de $0.5 \mu\text{m}$. La lumière d'un laser femtoseconde Ti:Sapphire sophistiqué (spectre de largeur 150 nm à 200 nm centré autour de 800 nm) a une longueur de cohérence autour de $2 \mu\text{m}$.

Notons cependant que cela ne veut pas dire qu'au-delà de la longueur de cohérence les interférences cessent brusquement d'exister, elles sont toujours présentes mais seulement moins contrastées.

Principe de l'OCT

L'OCT utilise directement le principe d'interférométrie à faible longueur de cohérence dans un montage de microscopie pour reconstruire une imagerie dans les 3 dimensions [44] comme sur la figure 2.11. De manière basique, il suffit de balayer le bras de référence dans la direction z de l'axe optique pour obtenir le profil de réflectance de l'échantillon en profondeur. En intégrant un mécanisme de balayage transverse en x on obtient des coupes transverses, semblables à celles de l'échographie ultrasonore appelées 'B-scans'. Enfin avec un balayage supplémentaire en y on reconstruit l'image 3D complète.

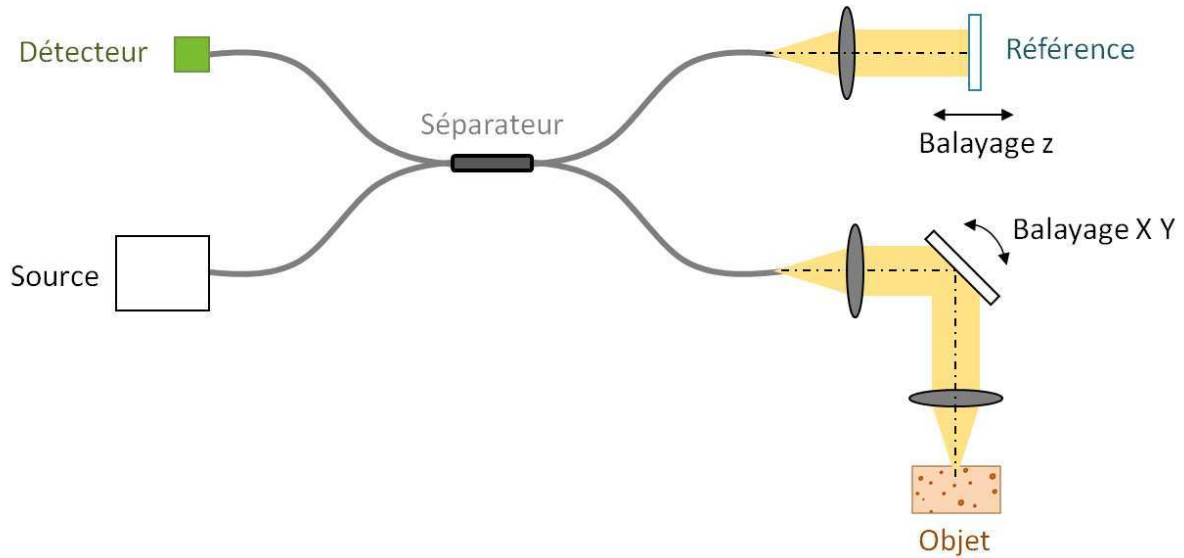


Figure 2.11 – Principe de l'OCT classique à balayage, basé sur un interféromètre de Michelson fibré.

Performances Nous avons vu que la résolution axiale (en z) dépend du spectre de la source. Suivant les montages il peut s'agir d'un laser (femtoseconde), diode superluminescente (SLD), diode électroluminescente (LED), ampoule quartz-halogène, pour des résolutions typiques entre 1 et 10 μm . La résolution transversale (en xy) dépend des composants optiques utilisés, notamment de l'ouverture numérique, comme expliquée en 2.2.1 page 14, et de l'échantillonnage du balayage. Elle est typiquement comprise entre 1 et 20 μm . Notons que, contrairement à la microscopie confocale présentée en 2.2.2 page 15, les résolutions axiale et transversale sont ici totalement découplées. On peut donc les choisir indépendamment l'une de l'autre suivant les applications visées.

La profondeur de pénétration se situe, suivant les systèmes et les tissus, autour de 0.5 à 2 mm.

L'imagerie par OCT permet d'obtenir de très bonnes sensibilités : en effet les signaux de rétrodiffusion par l'objet sont très faibles mais multipliés par un signal de référence qui est intense (formule 2.4). Ainsi on peut détecter des signaux correspondants à des coefficients de réflexion en intensité¹ de l'ordre de 10^{-9} ou 10^{-10} , que l'on exprime généralement en échelle logarithmique en décibels, $10 \log R$, soit -90 dB et -100 dB.

Autres approches et extensions de l'OCT

De multiples approches de l'OCT ont été développées, pour une étude complète nous renvoyons à la lecture du livre de référence "Optical Coherence Tomography" [44]. Pour citer les principales variantes :

OCT de Fourier On détecte le spectre $I(\lambda)$ qui est rétrodiffusé par l'objet via un spectromètre ou un réseau de diffraction. On voit sur l'équation 2.4 page 21 que la longueur d'onde λ et la différence de marche δ sont deux variables conjuguées dans l'espace de Fourier. En mesurant $I(\lambda)$ et en calculant sa transformée de Fourier on

1. On utilise ici la notion de coefficient de réflexion en intensité classique, soit à l'interface entre deux milieux d'indices n_1 et n_2 : $R = \left(\frac{n_1 - n_2}{n_1 + n_2}\right)^2$

obtient donc $I(\delta)$, le profil de rétrodiffusion en profondeur [45]. On balaye ensuite en xy pour reconstruire l'image 3D. L'avantage de cette approche est qu'elle est beaucoup plus rapide (moins de balayage) et a une meilleure sensibilité. En effet le bruit total est diminué en détectant en parallèle les signaux venant de toutes les profondeurs plutôt qu'en balayant un à un les signaux à chaque profondeur [46]. Comme un profil axial est enregistré en une seule fois il faut utiliser des optiques à grande profondeur de champ, ce qui signifie une faible ouverture numérique et donc une résolution transversale dégradée. Il existe cependant des solutions pour étendre la profondeur de champ en conservant la résolution [47]. L'OCT de Fourier est utilisée notamment dans les appareils d'ophtalmologie.

OCM La Microscopie de Cohérence Optique combine une approche OCT et une approche confocale de manière à imager à très haute résolution 'en face', c'est-à-dire dans un plan perpendiculaire à l'axe optique [48] [49].

OCT Doppler En mesurant le léger décalage en fréquence causé par l'effet Doppler sur les signaux d'interférence, on peut en déduire la vitesse du milieu observé. L'OCT Doppler enregistre une image OCT classique des vaisseaux sanguins, puis, connaissant ainsi leur orientation par rapport à l'axe optique, peut en déduire la vitesse de circulation sanguine [50].

OCT Spectroscopique Comme pour l'OCT dans le domaine de Fourier on détecte le spectre de rétrodiffusion. On en déduit une nouvelle information spectrale utile pour rajouter un contraste supplémentaire aux images, et qui peut être utilisée pour une imagerie moléculaire [51] ou fonctionnelle (contraste d'oxygénation) [52].

OCT à Polarisation En utilisant une détection sensible à la polarisation, on peut obtenir des informations sur la biréfringence des tissus, notamment les fibres de collagène ou les fibres nerveuses [53].

Nous allons nous intéresser dans la suite à une approche particulière appelée 'Plein Champ'.

2.3.2 L'approche OCT Plein Champ

L'OCT Plein Champ est une approche haute résolution proposée à la fin des années 1990 au Laboratoire d'Optique Physique de l'ESPCI (maintenant Institut Langevin) [54] [55] [56]. Elle enregistre des images 2D en orientation 'en face', plan xy , sans balayage.

Principe

L'idée est d'illuminer le champ de l'image en entier avec une source de lumière blanche de faible cohérence spatiale comme une lampe halogène². On utilise un capteur matriciel 2D de type caméra CCD (Charge-Coupled Device) ou CMOS (Complementary Metal-Oxide-Semiconductor) pour enregistrer une image 2D sans balayage. Le montage illustré

2. La cohérence spatiale caractérise la capacité à interférer entre deux photons venant de deux points de la source spatialement distincts. Les lasers et SLDs sont des sources cohérentes spatialement, contrairement aux sources thermiques halogènes ou aux LEDs.

sur la figure 2.12 peut être décrit essentiellement comme un microscope interférométrique (un microscope classique avec un bras de référence supplémentaire) ou comme un interféromètre de Michelson classique avec des objectifs de microscope, configuration appelée 'Linnik' [57].

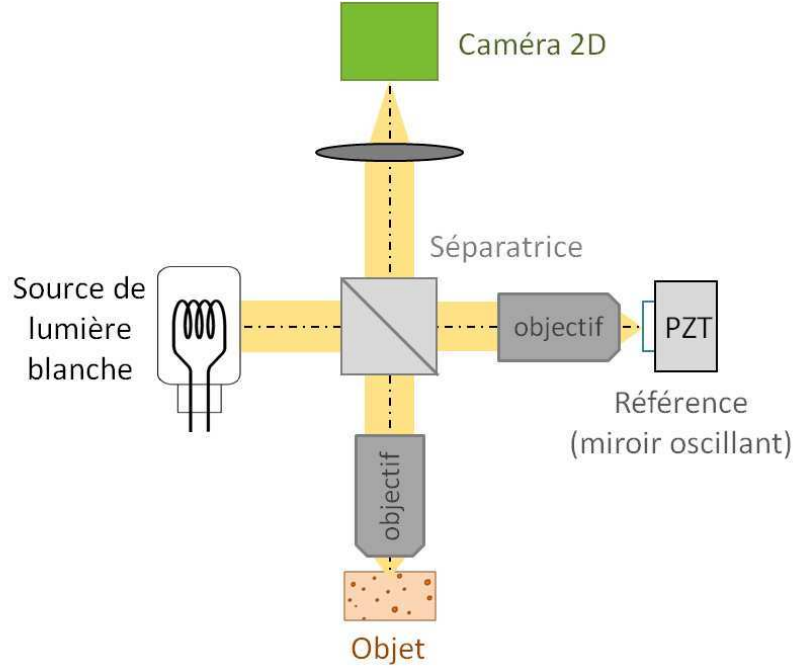


Figure 2.12 – Principe de l'OCT Plein Champ : l'interféromètre de Linnik à modulation de phase.

En adaptant l'équation d'interférences 2.4 page 21 à cette situation, si la source émet une intensité $4 I_0$, l'intensité $I(x, y)$ en un pixel de la caméra est :

$$I(x, y) = I_0 [R_r + R_{ob}(x, y) + 2 \sqrt{R_r R_{ob}(x, y)} \cos (\varphi(x, y) + \phi) + R_{inc}] \quad (2.6)$$

Avec :

- R_r la réflectivité du miroir de référence, on suppose qu'elle est la même en tout point (x, y) (miroir uniforme) ;
- $R_{ob}(x, y)$ la réflectivité de l'échantillon à la profondeur de cohérence ;
- $\varphi(x, y)$ la différence de phase entre les deux bras, c'est-à-dire $\frac{2\pi}{\lambda} \delta(x, y)$;
- ϕ une phase supplémentaire que l'on peut ajuster finement en déplaçant le miroir de référence ;
- R_{inc} la lumière incohérente venant des autres profondeurs de l'échantillon et des réflexions parasites sur les éléments optiques du montage.

La caméra détecte tous ces différents signaux, mais celui qui nous intéresse est $R_{ob}(x, y)$. $R_{ob}(x, y)$ représente la distribution des réflectivités de l'objet dans le plan de cohérence, c'est directement l'image tomographique 'en face'. Pour s'affranchir des autres termes on utilise une technique de modulation de phase contenue dans le terme ϕ [58]. L'idée est d'enregistrer puis de combiner plusieurs images I_i avec des phases ϕ_i différentes de manière à extraire uniquement le signal d'interférence. En pratique on utilise 4 phases

$\phi = 0, \pi/2, \pi, 3/2\pi$ correspondant à 4 images I_1, I_2, I_3, I_4 . Grâce à un peu de trigonométrie, on utilise la combinaison :

$$I_{image} = \sqrt{(I_1 - I_3)^2 + (I_2 - I_4)^2} = 4 I_0 \sqrt{R_r R_{ob}(x, y)} \quad (2.7)$$

On obtient ainsi une image proportionnelle à $\sqrt{R_{ob}(x, y)}$, i.e. à l'amplitude du signal rétrodiffusé.

On peut noter que ce déphasage ϕ est choisi pour un certain λ , et comme on travaille en spectre large il ne correspondra pas exactement à une demi longueur d'onde sur l'ensemble de la gamme du spectre. Cependant en pratique on optimise ϕ pour la longueur d'onde centrale et même si la modulation de phase est moins efficace pour les longueurs d'ondes les plus éloignées elle reste suffisante. Techniquement c'est grâce à un élément piezoélectrique (abrégié PZT) que l'on peut changer la phase de $\pi/2$, soit déplacer le miroir de $\lambda/4 \simeq 200$ nm dans l'air.

Performances

Résolution axiale Elle dépend du spectre utilisé ; une lampe halogène a un spectre extrêmement large, comme celui du soleil, mais on n'en utilise que la partie se situant dans la réponse spectrale du détecteur CCD ou CMOS, en évitant les longueurs d'ondes les plus courtes qui sont fortement diffusées. On a ainsi typiquement un spectre effectif allant de 650 à 850 nm, d'où une résolution théorique dans l'air de l'ordre de **1.2 μ m**.

Résolution transversale Elle est fonction des objectifs de microscope choisis. Typiquement, pour des objectifs de microscope 10x d'ouverture 0.3, la résolution théorique est **1.5 μ m**.

Vitesse La vitesse d'acquisition est limitée par les technologies disponibles pour la caméra. Avec une CMOS opérant à 150 Hz et une modulation à 4 phases, on obtient une image tomographique en 30 ms, soit un affichage à **35 Hz**.

Champ La profondeur de pénétration varie suivant les tissus ; en moyenne au-delà de 200 μ m l'image n'apporte plus d'informations pertinentes. Le champ en (xy) dépend des objectifs utilisés et du grandissement global du système. Avec des objectifs 10x d'ouverture 0.3 on obtient une image d'environ 0.8 x 0.8 mm bien échantillonnée sur le détecteur. Cependant, en déplaçant la zone d'imagerie dans l'échantillon et en recollant par un algorithme les images côte-à-côte comme une mosaïque, on peut imager des échantillons entiers bien plus grands. Typiquement l'image d'un échantillon de 2 cm² est ainsi obtenue en 7 minutes.

Sensibilité La sensibilité est définie en OCT comme le plus petit coefficient de réflectivité R_{min} qui peut être détecté, à la limite d'un rapport signal-sur-bruit (SNR) de 1. Le SNR théorique du montage, qui dépend notamment du détecteur, est dégradé par les aberrations induites par l'échantillon et par la diffusion multiple (on détecte certains photons dont le parcours de multi-diffusion est égal au balistique, donc dans la fenêtre de cohérence).

On peut l'évaluer rapidement de manière simplifiée (sans aberration ni diffusion multiple) à partir des équations 2.6 et 2.7 en raisonnant non plus en termes d'intensité mais en nombre de photoélectrons sur chaque pixel de la caméra N . On travaille avec la caméra à saturation, elle reçoit un nombre N_{sat} de photoélectrons. On suppose que l'on a choisi le miroir de référence de telle sorte que le signal de référence soit le signal dominant sur la caméra : $N_{sat} \simeq R_r N_0$. En supposant que le bruit soit exclusivement le bruit de photons [59], c'est un bruit blanc égal à la racine carrée du signal : $B = \sqrt{N_{sat}} = \sqrt{R_r N_0}$. Le rapport signal-sur-bruit est :

$$\text{SNR} = \frac{S}{B} = \frac{4 N_0 \sqrt{R_r R_{ob}}}{\sqrt{R_r N_0}} = 4 \sqrt{N_{sat}} \sqrt{\frac{R_{ob}}{R_r}} \quad (2.8)$$

A la limite de détection, $\text{SNR} = 1$, on a :

$$R_{min} = \frac{R_r}{16 N_{sat}} \quad (2.9)$$

Pour un miroir de référence en silicium immergé dans l'huile on a $R_r = 0.175$, et pour une caméra CMOS on a typiquement une capacité N_{sat} de 200 000 photoélectrons. La sensibilité pour une image est $R_{min} = 5.5 \cdot 10^{-8} = -73 \text{ dB}$. Si on accumule 10 images on obtient **-83 dB avec un affichage à 4 fps** (images par seconde), à 100 accumulations on obtient -93 dB mais il faut alors 2 secondes par image.

Avancées et applications

L'OCT Plein Champ a été adaptée dans un appareil industriel, baptisé le Light-CT scanner, de la société française LLTech (figure 2.13).



Figure 2.13 – Appareil industriel d'OCT Plein Champ, le Light-CT scanner de LLTech.

Cet appareil peut imager divers types de tissus en ciblant des applications médicales comme nous allons le voir, mais peut aussi être utilisé pour la recherche en biologie ou embryologie (figure 2.14), par exemple couplé à une technique en fluorescence [60].

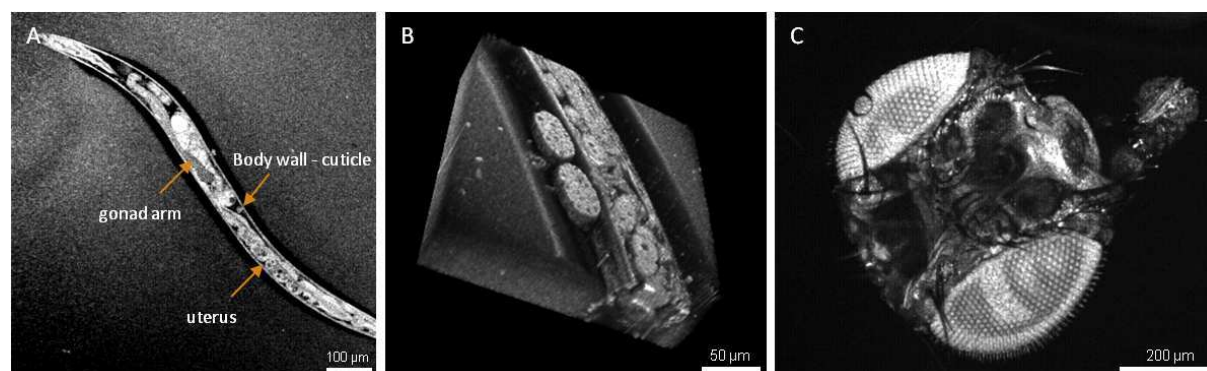


Figure 2.14 – Image d'OCT Plein Champ d'un ver *C. Elegans* en coupe (A) et en reconstruction 3D (B), et image d'une tête de drosophile (C).

La très haute résolution de l'OCT plein Champ lui permet d'obtenir des images comparables à celles obtenues par la procédure d'analyse histopathologique classique [61] [62].

Cette procédure demande à ce que l'échantillon soit fixé dans une solution à base de formol puis enrobé de paraffine pour pouvoir être coupé en fines tranches, d'épaisseur typique 5 à 10 μm , à l'aide d'un microtome. Puis les tranches sont déposées sur des lames de microscope et colorées suivant le contraste souhaité à l'aide d'agents classiques, comme l'hématoxyline et éosine 'H&E' (noyaux et cytoplasmes), le bleu de méthylène ou le safran (tissu fibreux). Chaque lame est examinée individuellement au microscope classique par le médecin anatomopathologiste qui effectue son diagnostic.

Ce protocole est souvent long : entre le moment de la biopsie et le moment du diagnostic il s'écoule plusieurs jours. Il peut se faire plus rapidement en per-opératoire, au mieux en un quart d'heure, dans le cadre d'un examen dit en 'frozen sections' pour lequel l'échantillon est cryogénisé juste après la biopsie pour pouvoir être découpé, coloré et examiné immédiatement. Cependant les images obtenues ainsi sont souvent moins précises [63].

L'OCT Plein Champ pourrait ainsi être un outil de diagnostic plus rapide pour les médecins anatomopathologistes en per-opératoire, par exemple au cours d'opérations d'exérèses de tumeurs, pour examiner notamment les berges cancéreuses [64]. Avoir un outil de diagnostic rapide permettrait de valider le geste du chirurgien et d'éviter une réopération future, ce qui arrive dans environ 20% des cas pour le sein [65].

Des études comparant les images d'OCT Plein Champ avec les images anatomopathologiques correspondantes ont été faites avec l'appareil commercial Light-CT scanner sur différents organes avec la collaboration de centres hospitaliers : sur le sein avec les hôpitaux Curie et Tenon [66] (figure 2.15), sur le cerveau avec l'hôpital Sainte-Anne (figure 2.16), sur la peau avec le CHU de Genève [67] (figure 2.17).

L'appareil d'OCT Plein Champ peut aussi être utilisé *in vivo* sur la peau, comme illustré sur la figure 2.18

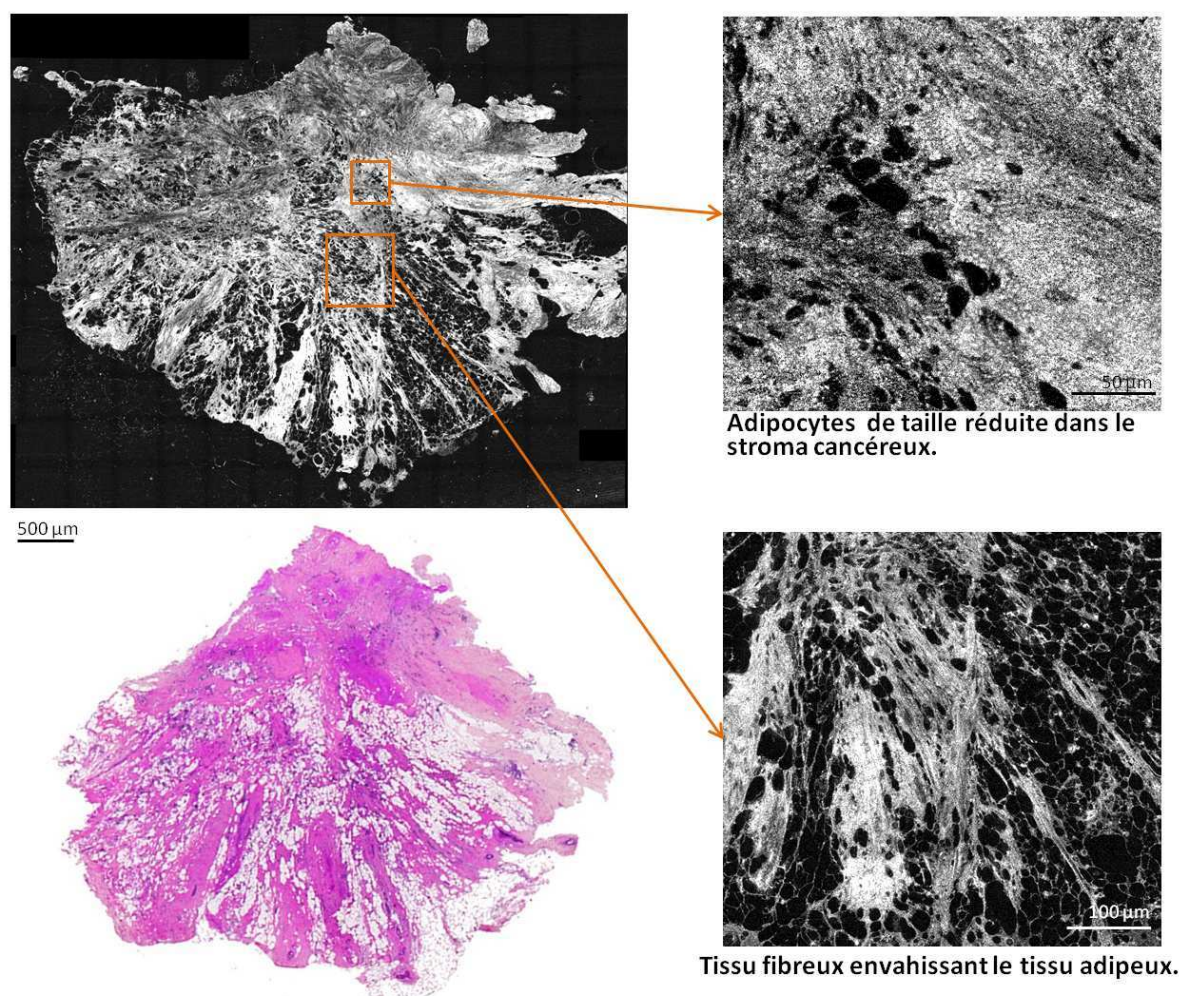


Figure 2.15 – Image d'OCT Plein Champ d'une biopsie de sein présentant une tumeur stellaire de type adénocarcinome invasif, et comparaison avec la coupe histologique correspondante sur le même échantillon.

2.3.3 Conclusion

Parmi les différents types d'OCT, l'approche Plein Champ présente un fort potentiel dans l'imagerie d'échantillons pour l'aide au diagnostic rapide de pathologies détectables au niveau cellulaire et morphologique, comme les cancers. Elle est également assez rapide et performante pour imager *in vivo*, comme démontré sur la peau, ce qui permettrait de plus d'effectuer un diagnostic sans avoir à exciser le tissu.

Cependant, son utilisation *in vivo* sur l'être humain se heurte à un problème technique de base : l'encombrement. Le système se présentant comme un microscope, il n'est pas possible d'atteindre d'autres organes que la peau, et seulement sur des zones comme l'avant-bras ou la main. Pour imager *in vivo* et *in situ*, c'est-à-dire sur des zones externes ou internes du corps difficiles d'accès, il faut combiner le système d'imagerie avec un appareil d'endoscopie qui utilise une sonde, souple ou rigide, pour inspecter l'organe de la manière la moins invasive possible.

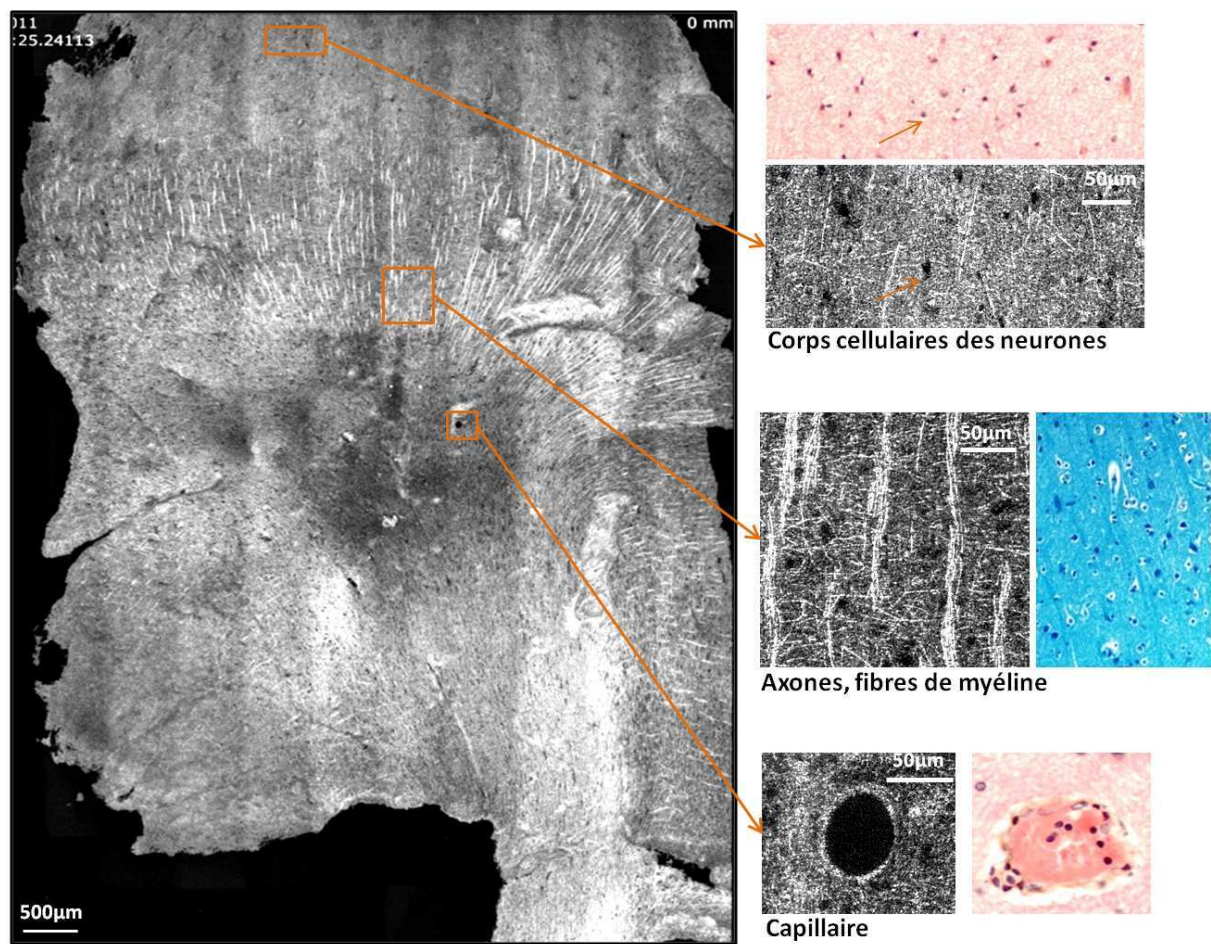


Figure 2.16 – Image d'OCT Plein Champ d'une biopsie de cerveau (cortex) montrant les différentes structures, comparées à des images histologiques de référence.

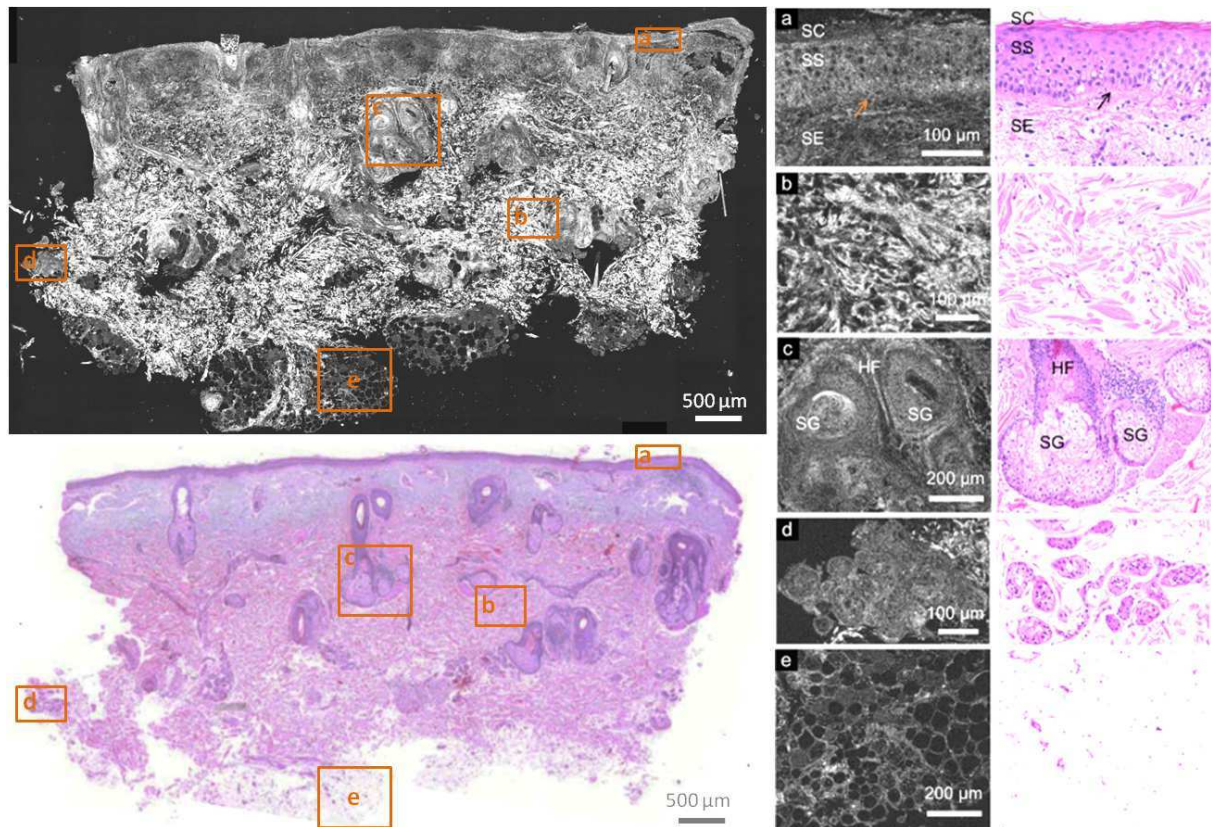


Figure 2.17 – Image d'OCT Plein Champ d'une biopsie de peau montrant les différentes couches et structures, et comparaison avec la coupe histologique correspondante sur le même échantillon. a : Epidermis avec le Stratum Corneum (SC), Stratum Spinosum (SS), Superficial Elastic Dermis (SE). b : Collagène. c : Unité Pilo-sébacée avec un follicule pileux (HF) et des glandes sébacées (SG). d : Glande sudoripare. e : Adipocytes.

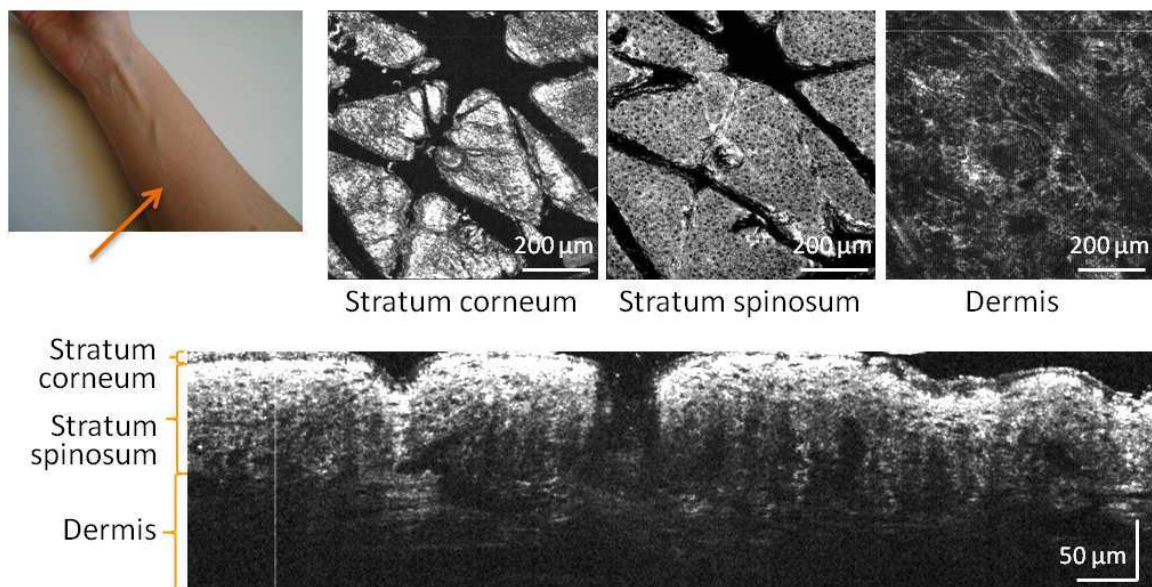


Figure 2.18 – Image d'OCT Plein Champ réalisée sur la peau de l'avant-bras *in vivo*, montrant les différentes couches de l'épiderme au derme.

CHAPITRE 3

Imager *in situ* : l'imagerie optique couplée à l'endoscopie

Table des matières

3.1	L'endoscopie, un outil de routine dans le domaine médical	32
3.1.1	Les différents endoscopes	32
3.1.2	Les contrastes classiques de l'endoscopie	33
3.2	L'imagerie optique des tissus couplée à l'endoscopie	36
3.2.1	La microscopie en endoscopie	36
	La microscopie photo-acoustique en endoscopie	36
	La microscopie confocale en endoscopie	37
	La microscopie à 2 photons en endoscopie	38
3.2.2	L'OCT en endoscopie	38
	L'OCT en endoscopie flexible	38
	L'OCT en endoscopie rigide	40
3.2.3	Conclusion	41

L'endoscopie existe depuis le début du XIX^{ème} siècle, mais c'est à partir du siècle suivant qu'elle s'est largement répandue dans le monde médical, mais aussi industriel, comme moyen d'exploration de cavités autrement inaccessibles.

Un endoscope se présente comme un tube optique muni d'un système d'illumination. Il permet d'imager soit directement à l'aide d'une caméra miniature intégrée, soit en transportant une image d'un bout à l'autre avec un assemblage de composants optiques. Cette sonde permet d'accéder aux organes internes par les voies naturelles (voies respiratoires et digestives) ou par une petite incision (système cardiovasculaire, cerveau). L'endoscopie permet ainsi au praticien d'effectuer un diagnostic de la manière la moins invasive possible. En plus d'un canal d'imagerie, certains endoscopes possèdent en plus des canaux opératoires dans lesquels un chirurgien peut faire passer ses outils au cours d'interventions de microchirurgie : on parle d'endoscopie interventionnelle.

Dans ce chapitre nous allons donner un aperçu des possibilités de l'endoscopie actuelle et de son couplage avec les techniques d'imagerie optiques déjà présentées, pour conclure sur l'intérêt d'adapter l'OCT Plein Champ à l'endoscopie.

3.1 L'endoscopie, un outil de routine dans le domaine médical

3.1.1 Les différents endoscopes

Il existe une large gamme d'endoscopes, dont les caractéristiques sont adaptées à chaque organe. On peut diviser les endoscopes en deux grandes catégories : flexibles et rigides, auxquels on peut rajouter la catégorie des cathéters, tubes flexibles utilisés pour faire accéder divers outils aux artères.

L'endoscopie flexible est majoritairement utilisée pour l'examen des voies respiratoires (trachée, poumons) et digestives (oesophage, estomac, duodenum, colon) qui représentent 1.1 million d'examens chaque année en France [68]. La figure 3.1 présente un exemple d'endoscope flexible pour l'examen des voies digestives basses, appelé un coloscope. Le tube d'insertion, la partie en contact avec le patient, comprend des poignées de contrôle permettant au praticien de diriger le dispositif (orientation, aspiration, eau, image, lumière). L'extrémité distale du tube d'insertion peut être recourbée à un angle de 180° en 'rétrovision'. L'extrémité proximale de l'endoscope est reliée au module de base pour l'éclairage et le traitement d'image. Pour des raisons de confort du patient, les procédures d'endoscopies sont réalisées sous anesthésie locale ou générale. Le temps nécessaire peut varier de 2 minutes pour une gastroscopie simple à 30 minutes voire plus d'une heure pour une coloscopie complexe.

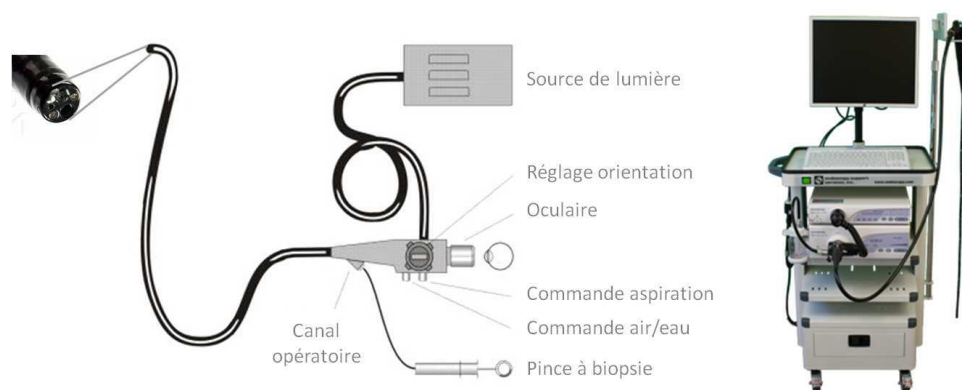


Figure 3.1 – Endoscope flexible et tour de base (marque Olympus).

Les endoscopes flexibles disposent en général d'une caméra miniaturisée à l'extrémité distale, ils peuvent aussi utiliser un faisceau de fibres optiques pour transporter l'image. Les endoscopes rigides fonctionnent sur le même principe, mais le transport d'image est assuré par un assemblage de lentilles, micro-lentilles, ou de lentilles à gradient d'indice (GRIN) qui sont des lentilles de forme cylindrique à faible diamètre (0.5 à 2 mm) et grande longueur (10 à 200 mm). Les endoscopes rigides permettent notamment l'inspection des organes de la cavité abdominale via une incision (laparoscopie, souvent au cours d'une opération chirurgicale), de l'utérus (hystéroscopie), de la vessie et la prostate (cystoscope), des articulations (arthroscope)... (figure 3.2).



Figure 3.2 – Endoscopes rigides : néphroscope, cystoscope, et uretéro-rénoscope avec canal opératoire (marque LUT).

Au cours de l'examen endoscopique le praticien peut décider d'effectuer des biopsies sur des zones suspectes en faisant passer une pince à biopsie par le canal opératoire. Ainsi sur les 1.1 millions d'endoscopies digestives effectuées chaque année en France, 70% révèlent une anomalie, qui donne ensuite lieu à des biopsies dans 15% des cas en ce qui concerne l'oesophage à 95% des cas pour l'estomac [69]. Pour certains organes comme le sein les biopsies sont effectuées à l'aide d'une aiguille fine insérée dans l'organe qui aspire un petit échantillon de tissu (typiquement 1 mm^2 sur 5 mm de long).

3.1.2 Les contrastes classiques de l'endoscopie

L'image obtenue par endoscopie est une image de surface en lumière blanche classique, correspondant à une inspection visuelle du praticien (figure 3.3).

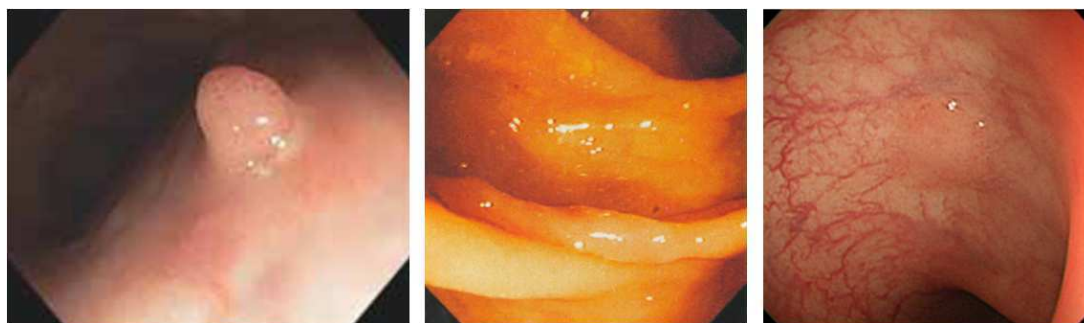


Figure 3.3 – Images obtenues en lumière blanche lors d'endoscopies du colon présentant un polype (gauche), un polype aplati (milieu), un adénome (droite). D'après [70].

Cependant il est possible d'obtenir des contrastes supplémentaires en utilisant les techniques de chromoendoscopie par marquage avec des colorants exogènes, d'imagerie à bande spectrale étroite (NBI pour Narrow-Band Imaging), ou d'imagerie d'autofluorescence de surface (AFI pour AutoFluorescence Imaging) [71].

Chromoendoscopie

La chromoendoscopie consiste en l'application de colorants sur les parois muqueuses, en général par vaporisation, afin d'identifier de manière ciblée certains tissus ou pathologies. La muqueuse peut être préalablement nettoyée de son mucus à l'aide d'acide acétique. Les colorants les plus utilisés sont la solution de Lugol, à base d'iode, qui est absorbée par l'épithélium squameux non kératinisé¹, le bleu de Méthylène absorbé par l'épithélium (utilisé pour le diagnostic de la pathologie de l'oesophage de Barrett²), ou encore l'indigo carmine qui passe entre les irrégularités de la muqueuse et les met en valeur (voir figure 3.4). [72] [73]



Figure 3.4 – Images endoscopiques d'un colon montrant un site cicatrisé de polypectomie, en lumière blanche (gauche), après coloration par indigocarmine (droite). D'après [72].

1. L'épithélium est un tissu constitué de cellules étroitement juxtaposées, sans interposition de fibres, qui remplit deux fonctions physiologiques : fonction de revêtement (surface des organes et muqueuses) et fonction glandulaire. L'épithélium n'est en général pas vascularisé, l'apport des nutriments et l'export des déchets se faisant par l'intermédiaire d'une lame de cellules basales.

2. En cas de reflux gastro-œsophagien pathologique, la muqueuse du bas de l'oesophage est exposée de façon chronique à l'acidité du liquide gastrique contre lequel elle n'est pas protégée. On peut assister à la transformation de l'épithélium normal en un épithélium de type intestinal, pathologie appelée endobrachyoesophage (EBO) ou oesophage de Barrett (BE), qui peut dans certain cas évoluer vers un adénocarcinome (tumeur maligne) et nécessite donc une surveillance endoscopique.

Endoscopie à bande spectrale étroite NBI

L'endoscopie à bande étroite met en valeur les capillaires à la surface de la muqueuse en utilisant deux bandes spectrales étroites, typiquement [440-460 nm] et [540-560 nm], dans lesquelles la lumière est plus fortement absorbée par l'hémoglobine (figure 3.5). Cette technique est notamment utile pour le diagnostic de l'oesophage de Barrett, ou encore la classification des polypes dans le colon [74].



Figure 3.5 – Images endoscopiques d'un colon pathologique présentant un adénome (tumeur bénigne), en lumière blanche (gauche), en bande spectrale étroite NBI (milieu), en bande spectrale étroite NBI avec une plus grande magnification (droite). D'après [70].

Endoscopie d'auto fluorescence AFI

Certains tissus contiennent des fluorophores naturels tels que le collagène, la NADH (coenzyme participant au métabolisme de l'ATP), ou les acides aminés aromatiques. Les tissus normaux et certains tissus pathologiques ont des compositions et donc des spectres d'auto fluorescence différents, ce qui permet de les distinguer. Cette technique est notamment utile pour le diagnostic de l'oesophage de Barrett [71].

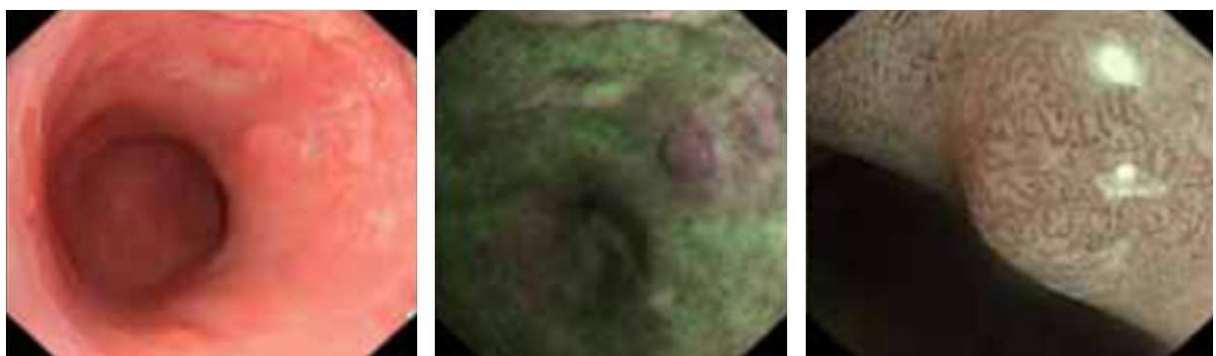


Figure 3.6 – Images endoscopiques d'un oesophage pathologique : oesophage de Barrett présentant une néoplasie intraépithéliale (prolifération anormale de cellules dans l'épithélium), en lumière blanche (gauche), en autofluorescence AFI (milieu), en bande spectrale étroite NBI (droite). D'après [70].

3.2 L'imagerie optique des tissus couplée à l'endoscopie

Si l'échographie ultrasonore endoscopique, apparue dans les années 1980, est maintenant utilisée en routine médicale [75] [76], certaines techniques d'imagerie optique discutées au chapitre 2 sont maintenant également adaptées pour l'endoscopie, à des stades cliniques plus ou moins poussés. On comprend aisément dans un contexte médical l'intérêt présenté par un tel couplage, qui permettrait d'augmenter la précision et la vitesse du diagnostic du praticien, tout en améliorant le confort du patient.

Pour chaque modalité des améliorations techniques spécifiques sont nécessaires, avec des contraintes imposées par l'organe ou le tissu à imager : principalement les dimensions et la flexibilité de la sonde optique, le champ, la résolution, la vitesse d'acquisition, la stabilité de l'image par rapport aux mouvements de l'objet. Concernant la conception de la sonde, il y a trois approches possibles [77] :

Approche rigide non fibrée Les optiques sont assez miniaturisées pour imager à distance ou via des lentilles 'relais' comme des GRIN, ce qui permet d'imager des zones comme la peau ou l'oeil, et les organes internes en pénétrant comme une aiguille.

Approche flexible à fibre optique Un balayage distal est effectué par des composants électroniques et optiques miniaturisés, souvent des miroirs MEMS (Micro-Electro-Mechanical Systems). Une image 2D peut aussi être obtenue dans certains cas sans balayage par encodage spectral de la profondeur. La difficulté technique est la miniaturisation des composants.

Approche flexible à faisceau de fibres optiques Le faisceau de fibres transporte directement une image 2D, il peut être utilisé en plein champ ou avec un balayage proximal de chaque coeur du faisceau. Il n'y a pas de problèmes de miniaturisation de la tête de la sonde, ce qui permet d'obtenir des petits diamètres (< 1 mm). Cependant la qualité d'imagerie en profondeur peut alors être dégradée par l'absence de balayage du plan focal.

Nous allons présenter ici les approches et avancées dans ce domaine de la microscopie photo-acoustique, la microscopie confocale, la microscopie à deux photons, et enfin l'OCT.

3.2.1 La microscopie en endoscopie

La microscopie photo-acoustique en endoscopie

De récentes avancées permettent à la microscopie photo-acoustique, présentée en 2.1.2 page 11, d'être adaptée pour l'endoscopie (Photo-Acoustic Endoscopy ou PAE), notamment des voies digestives ou en intravasculaire [78] [79]. Un exemple de design d'une sonde endoscopique PAE est présenté sur la figure 3.7, il permet d'imager jusqu'à 7 mm de profondeur [14]. Les travaux portent actuellement sur une meilleure miniaturisation des sondes (2 à 3 mm de diamètre pour le moment), et sur les premiers essais *in vivo*.

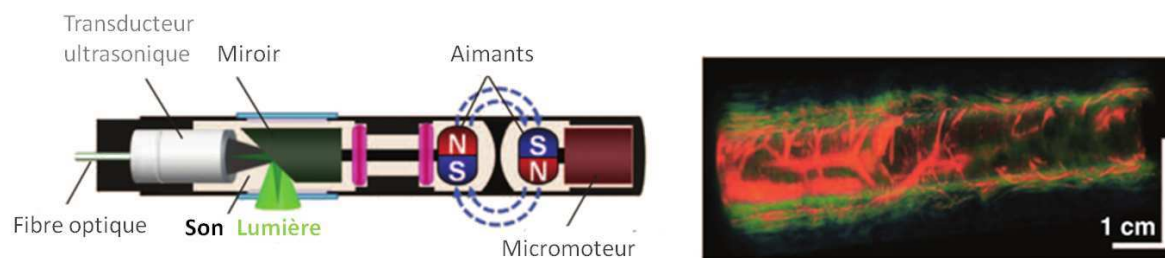


Figure 3.7 – Principe de l'endoscopie photo-acoustique (PAE) et image d'un oesophage de rat *ex vivo*. D'après [14].

La microscopie confocale en endoscopie

Les premiers travaux concernant des systèmes de microscopie confocale avec sonde (souvent appelée endomicroscopie confocale, soit 'Confocal EndoMicroscopy' ou CEM) datent du début des années 1990 [80]. Plusieurs systèmes ont été démontrés, soit en intégrant un microscope confocal miniature (balayage par MEMS) à l'extrémité distale d'une fibre optique [81], soit en utilisant un encodage spectral avec une sonde par fibre optique [40] [82], soit avec un bras articulé ou flexible et une tête portative contenant les optiques [83], soit avec un faisceau de fibres [84] [85]. La microscopie confocale peut être couplée avec une autre technique, par exemple l'OCT, dans une même sonde [86]. Les performances endoscopiques sont proches de la microscopie confocale classique, avec des résolutions entre 0.5 et 5 μm et des profondeurs d'imagerie jusqu'à 100 μm .

Cette technique est maintenant très mature et utilisée dans le domaine clinique, que ce soit en mode de réflectance ou de fluorescence endogène et exogène. Deux sociétés commercialisent des appareils confocaux.

LucidTech propose des appareils à tête mobile portable pour l'imagerie de la peau en réflectance [87] (voir figure 3.8). La stabilité mécanique du tissu est assurée par la pose d'un anneau pressé sur la peau, ce qui permet aussi de recoller plusieurs images adjacentes (mosaïque) pour obtenir une image à plus grand champ.

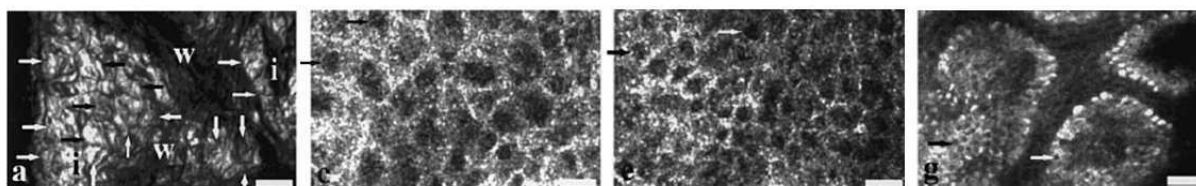


Figure 3.8 – Images d'endomicroscopie confocale de peau humaine *in vivo* prises avec la sonde Vivascope de LucidTech. a : stratum corneum (surface). c : stratum granulosum (profondeur 20 μm). e : stratum spinosum (profondeur 20-100 μm). g : derme papillaire avec cellules basales (profondeur 100 μm). Barre d'échelle 25 μm . D'après [83]

Les sondes confocales flexibles CellVizio de Mauna Kea Technologies reposent sur un transport par faisceaux de fibres et un balayage proximal [84]. Avec des diamètres de 0.3 à 4 mm, elles sont principalement utilisées sur le petit animal, les voies digestives [88], les voies respiratoires [89] [90] [91] (figure 3.9). Un recalage informatique des images est effectué pour compenser les mouvements des tissus et reconstruire des mosaïques à grand

champ [92].

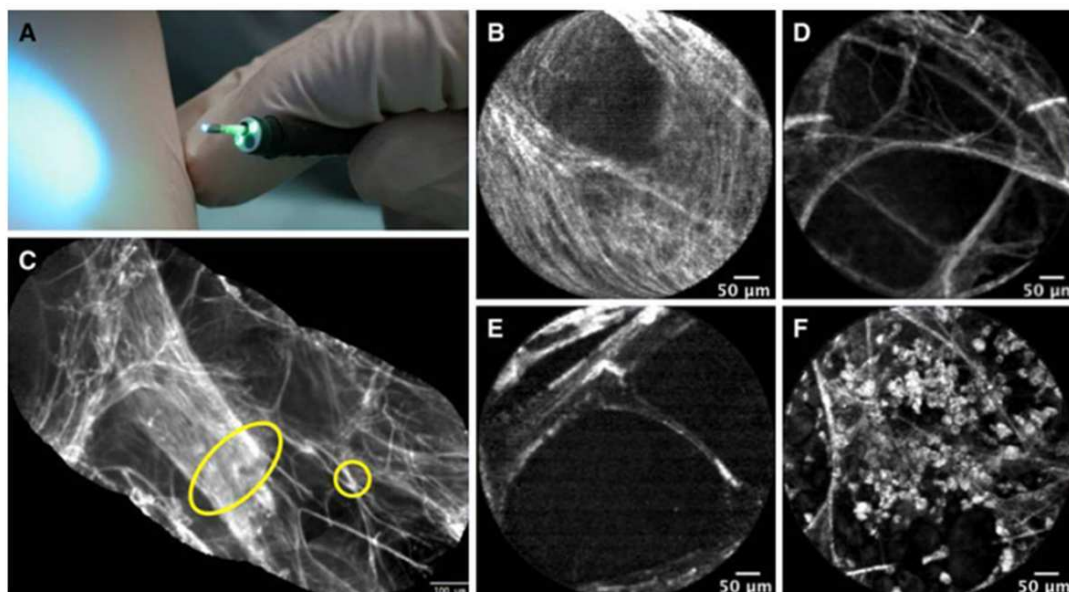


Figure 3.9 – Images d'endomicroscopie confocale fibrée de poumon humain *in vivo*. a : la sonde de diamètre 1.4 mm est insérée dans le canal opératoire d'un bronchoscope. b : paroi d'une bronche saine. c : paroi en mosaïque montrant le réseau d'élastine d'un microvaisseau (ellipse) et une paroi septale (cercle). d : zone d'emphysème modéré avec réduction de l'élastine. e : bullous avec peu de fibres élastiques. f : alvéoles d'un poumon de fumeur avec macrophages. D'après [84]

La microscopie à 2 photons en endoscopie

Différents systèmes de microscopie à 2 photons endoscopiques ont été proposés, soit en sonde flexible avec fibre optique et balayage distal miniaturisé [93], soit en sonde rigide avec des lentilles GRIN [94]. Ces systèmes gardent des résolutions typiques entre 0.5 et 7 μm à des profondeurs d'imagerie jusqu'à 0.5 voire 1 mm, pour des diamètres de sondes aussi petits que 1 mm. Ils ont été utilisés dans un contexte de recherche *ex vivo* sur l'humain et *in vivo* sur le petit animal, notamment dans le cerveau [95], le rein ou le colon [94] (voir figure 3.10).

3.2.2 L'OCT en endoscopie

Les montages classiques d'OCT reposant souvent sur un interféromètre fibré, il n'a fallu que quelques années après l'invention de l'OCT pour qu'apparaissent les premiers systèmes prévus pour une utilisation endoscopique *in vivo* [96]. A ce jour des méthodes très diverses ont été démontrées, utilisant des sondes flexibles ou rigides conçues avec des fibres optiques, des assemblages de micro-lentilles ou de lentilles GRIN [44].

L'OCT en endoscopie flexible

Une application majeure de l'OCT endoscopique est l'imagerie intravasculaire, notamment pour la caractérisation des plaques d'athérome et le diagnostic des pathologies car-

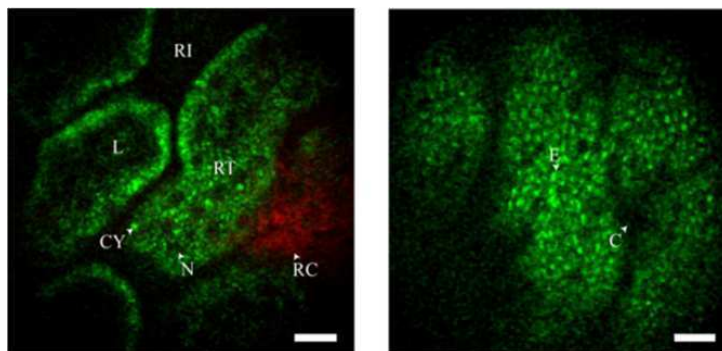


Figure 3.10 – Images en endomicroscopie à deux photons de tissus de rat *in vivo* en fluorescence endogène. gauche : rein, cortex superficiel. droite : colon, paroi interne. Barre d'échelle 20 μm . D'après [94]

diovasculaires [97] [98] (figure 3.11). Les systèmes commerciaux (LightLab Imaging, St. Jude Medical) offrent une résolution de l'ordre de 5-10 μm transversale et 20-25 μm axiale, avec un diamètre de sonde inférieur au millimètre ce qui permet son insertion dans les cathéters courants. Pour l'imagerie intravasculaire la sonde fonctionne en visée latérale (champ de vue parallèle à la direction de la sonde) avec un balayage rapide circulaire combiné à un mouvement de retrait (appelé 'pull-back'), de manière à reconstruire le volume de l'artère complet en quelques secondes. L'OCT intravasculaire peut être couplée à l'échographie ultrasonore intravasculaire dans une sonde qui combine les informations en profondeur à l'échelle millimétrique apportées par l'échographie et celles plus en surface à l'échelle micrométrique de l'OCT [99].

Des sondes semblables peuvent être utilisées pour l'imagerie des voies digestives, ou respiratoires [100]. D'autres sondes sont conçues pour imager à l'extrémité distale en visée frontale (champ de vue perpendiculaire à la direction de la sonde), notamment avec l'approche OCM [48] qui permet des résolutions de 2 à 4 μm (figure 3.12).

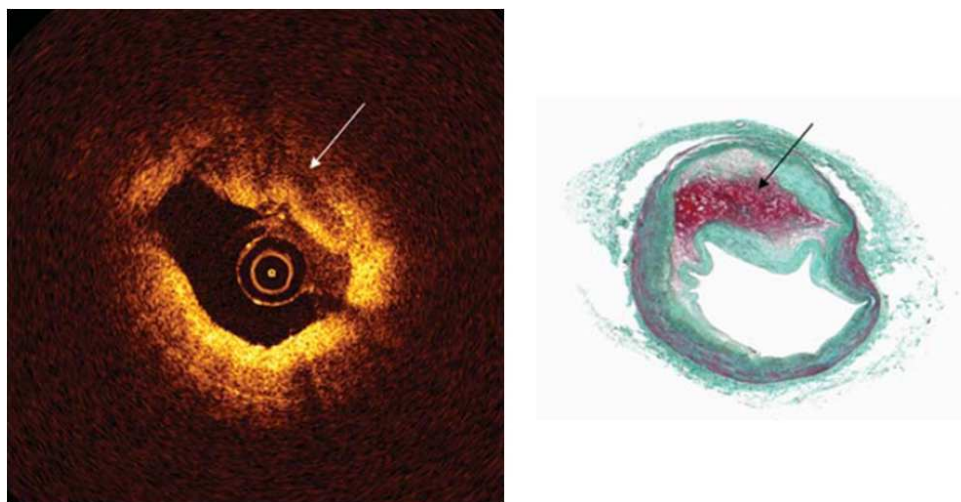


Figure 3.11 – Image OCT endoscopique intravasculaire *in vivo* d'une plaque avec hémorragie (flèche) et section histopahtologique correspondante. D'après [98].

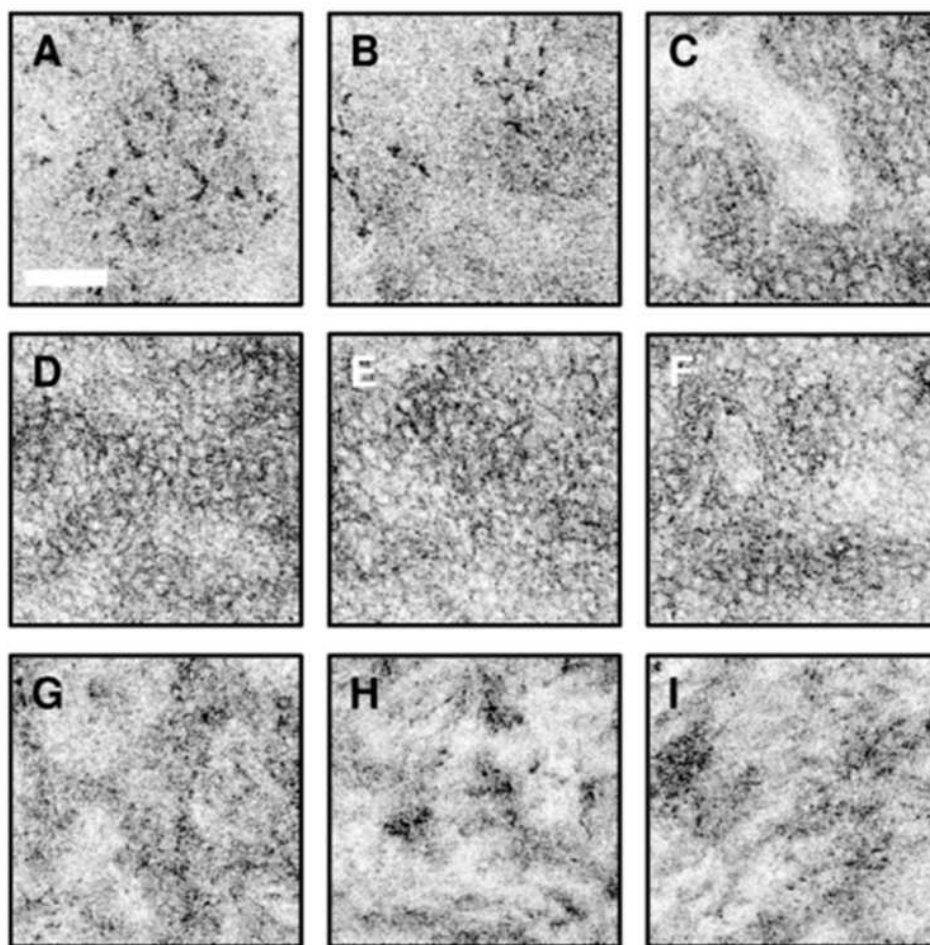


Figure 3.12 – Images OCM endoscopique de peau humaine *in vivo*, profondeurs croissantes de la surface jusqu'à 400 μm . A-C : stratum corneum, D-F : epidermis, G-I : dermis. Barre d'échelle 100 μm . D'après [48].

L'OCT en endoscopie rigide

Etant donné que la profondeur de pénétration de l'OCT ne dépasse pas 1 mm, l'imagerie même endoscopique des organes internes ne permet pas d'avoir une vision de la partie intérieure de l'organe. Pour cela il est nécessaire d'avoir une sonde rigide, soit qui agisse comme une aiguille en perçant le tissu, soit que l'on insère dans une aiguille habituellement utilisée pour prélever des biopsies. Un tel système a d'abord été démontré en 2000 [101], et depuis diverses sondes ont été proposées, atteignant des diamètres inférieurs à 0.5 mm, notamment pour guider les biopsies dans le sein [102] ou le poumon en vue latérale [103] [104] (voir figure 3.13). Dans un tel système l'OCT peut aussi être couplée à des méthodes élastographiques pour avoir accès en plus de l'image morphologique à l'élasticité du tissu [105].

Une autre application de l'OCT endoscopique se fait avec une sonde rigide à visée frontale, tenue à la main, utilisée lors des interventions chirurgicales sur le petit animal [106], ou sur l'homme, par exemple dans le cerveau de manière à repérer les vaisseaux sanguins situés en amont de la sonde et ainsi éviter de les sectionner au cours de l'opération [107].

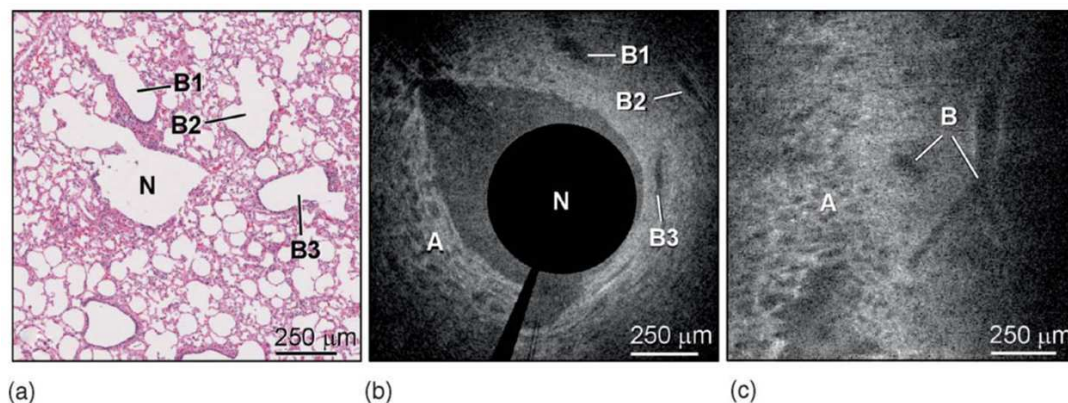


Figure 3.13 – Images OCT endoscopique aiguille de poumon humain *ex vivo* en vue radiale (b) et projection orthogonale (c), et section histopathologique H&E correspondante (a). 'N' : trou de l'aiguille, 'A' : alvéole, 'B' : bronchiole. D'après [103]

3.2.3 Conclusion

L'endoscopie est un outil précieux pour le diagnostic et le traitement par micro-chirurgie de nombreuses pathologies, dans l'esprit d'intervenir de la manière la moins invasive possible. Il est naturel que les techniques d'imageries ou de microscopies optiques biomédicales ayant fait preuve de leur utilité *ex vivo* soient donc implémentées pour l'endoscopie. La microscopie confocale notamment et différentes approches OCT commencent à être utilisées en routine, principalement en intravasculaire, dans les voies respiratoires et digestives, et sur la peau.

Cependant il n'existe pas à ce jour d'adaptation endoscopique de l'approche Plein Champ de l'OCT. Nous avons vu son intérêt au chapitre 2 par la qualité de ses images, comparables aux sections histopathologiques de référence. De plus, cette approche ne requiert pas de balayage pour prendre une image, il n'y aurait donc pas de mécanismes de balayage à miniaturiser, ce qui est un avantage technique pour un montage avec sonde.

Nous allons donc proposer dans la suite des implémentations de l'OCT Plein Champ avec une sonde flexible (chapitres 4, 5 et 6), puis avec une sonde rigide (chapitre 7).

Deuxième partie

L'imagerie par Tomographie de Cohérence Optique Plein Champ pour l'endoscopie flexible

CHAPITRE 4

Principe d'un OCT Plein Champ à deux interféromètres

Table des matières

4.1	Fonctionnement d'un système d'OCT à 2 interféromètres	46
4.1.1	Intérêt d'un montage à 2 interféromètres pour l'endoscopie . .	46
4.1.2	Signal OCT à 2 interféromètres	47
4.1.3	Détails du montage expérimental de FFOCT	50
4.2	Performances du système	51
4.2.1	Résolutions transversale et axiale	51
4.2.2	Amélioration de la sensibilité	54
4.2.3	Conclusion	54

Contrairement à la majorité des autres approches de l'OCT qui sont fibrées, l'OCT Plein Champ (FFOCT pour 'Full-Field OCT') est une technique d'interférométrie en espace libre. Plusieurs questions se posent alors quant à l'implémentation de cette approche dans un appareil endoscopique avec sonde flexible. Pour enregistrer une image 2D 'en face' sans balayage, il faut que la sonde ait la capacité de transporter une telle image, la seule possibilité est alors d'utiliser un faisceau de fibres optiques. Cependant l'intégration directe d'un faisceau de fibres dans un interféromètre pose le problème de l'intégrité du signal interférométrique au passage dans chaque fibre. Dans ce chapitre nous allons proposer et détailler une solution en utilisant un montage OCT à deux interféromètres.

4.1 Fonctionnement d'un système d'OCT à 2 interféromètres

4.1.1 Intérêt d'un montage à 2 interféromètres pour l'endoscopie

Si on se réfère au principe de la FFOCT (figure 2.12 page 24), il semblerait à première vue qu'une adaptation endoscopique simple serait d'intégrer le faisceau de fibres optiques directement dans le bras objet de l'interféromètre. Cependant il faudrait alors compenser ce nouveau chemin optique par un deuxième faisceau de fibres parfaitement identique dans le bras de référence. Or, comme nous le verrons ensuite, il y a peu de faisceaux disponibles dans le commerce (3 constructeurs : Sumitomo, Fujikura, Schott) et ils sont tous multimodes. Lors de l'utilisation *in vivo* du système, la sonde objet serait soumise à divers mouvements et torsions qui modifieraient alors la propagation de la lumière de manière différente dans chaque fibre, ce qui rendrait extrêmement difficile la compensation des chemins optiques. Le signal interférométrique résultant serait alors fortement dégradé. Il est pour cela préférable pour un usage *in vivo* et *in situ* dans un milieu médical que la sonde soit la plus insensible possible à son environnement, et ne soit donc pas partie intégrante d'un bras d'interféromètre.

Une solution dans cet esprit est d'utiliser un montage OCT non plus à un mais à deux interféromètres, ce qui a été proposé pour la première fois en 2005 [108] (figure 4.1). Un premier interféromètre, appelé 'contrôleur', illuminé par une source toujours incohérente, est extérieur à la sonde. Un deuxième interféromètre, appelé 'imageur', situé à l'extrémité distale de la sonde, recueille la lumière rétrodiffusée par l'objet. La superposition des signaux venant des deux interféromètres arrive sur un détecteur. La sonde assure la liaison entre les deux interféromètres sans en faire partie, ainsi elle est entièrement passive et sert

uniquement à transporter une image.

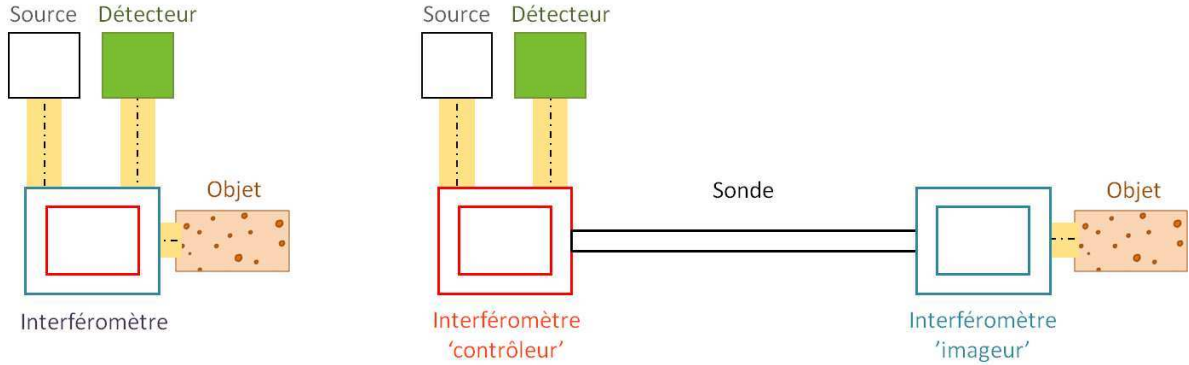


Figure 4.1 – Principe général d'un système d'OCT (gauche), et d'un système d'OCT à 2 interféromètres (droite).

4.1.2 Signal OCT à 2 interféromètres

Le signal détecté par la caméra est différent du signal OCT classique, décrit au chapitre 2 page 23 : il est ici la superposition des deux signaux interférométriques venant des deux interféromètres couplés de façon incohérente.

Le premier interféromètre contrôleur est formé par deux surfaces réfléchissantes illuminées par une source à large spectre, situation analogue à celle présentée en 2.3.1 page 20. Il en résulte une modulation du spectre par une fonction sinusoïdale :

$$S_{\text{contrôle}}(\sigma) \sim S(\sigma) (1 + C_c(\sigma) \cos(2\pi\delta_{\text{contrôle}} \sigma)) \quad (4.1)$$

avec σ le nombre d'onde défini par $\sigma = \frac{1}{\lambda}$ (en cm^{-1}), $S_{\text{contrôle}}(\sigma)$ le spectre en sortie de l'interféromètre contrôleur, $S(\sigma)$ le spectre de la source en entrée de l'interféromètre, C_c le terme de contraste, $\delta_{\text{contrôle}}$ la différence de marche de l'interféromètre contrôleur. Les calculs aboutissant à cette formule sont détaillés en annexe B.

Le spectre résultant est appelé spectre cannelé. Son enveloppe est le spectre de la source, la période des franges (les cannelures) dépend de la différence de marche : précisément elle est égale à $\frac{1}{\delta}$, comme illustré sur la figure 4.2. L'interféromètre contrôleur est dirigé par l'utilisateur, qui définit la différence de marche 'de contrôle', et donc le spectre cannelé contrôleur.

Le spectre cannelé créé par l'interféromètre contrôleur est injecté dans la sonde et illumine le deuxième interféromètre imageur. Dans celui-ci deux faisceaux interfèrent : d'une part la lumière rétrodiffusée par l'objet, et d'autre part la lumière de référence, créée dans l'interféromètre par une surface réfléchissante. Cet interféromètre produit donc en sortie une modulation additionnelle du spectre, de manière similaire à l'interféromètre contrôleur, à une fréquence donnée par la différence de marche δ_{image} entre l'objet et la référence. Sur la gamme spectrale utilisée et les différences de marche faibles nous pouvons négliger les effets de dispersion entre les deux interféromètres. Le spectre en

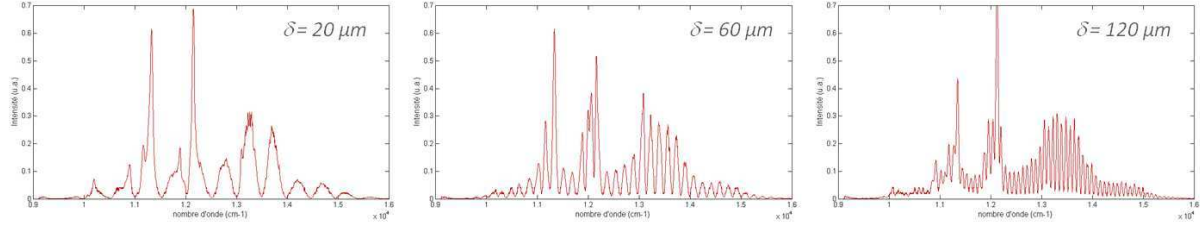


Figure 4.2 – Spectres cannelés mesurés en sortie de l'interféromètre contrôleur illuminé par une source à arc au Xénon, à différentes différences de marche δ (résultats expérimentaux mesurés avec un spectromètre).

sortie de l'interféromètre imageur est :

$$S_{image}(\sigma) \sim S_{entrée}(\sigma) (1 + C_i \cos(2\pi\delta_{image} \sigma)) \quad (4.2)$$

avec $S_{entrée}(\sigma)$ le spectre en entrée de l'interféromètre imageur, en l'occurrence $S_{contrôle}(\sigma)$, et C_i le terme de contraste qui contient l'information sur l'objet (voir annexe B).

Le détecteur reçoit la lumière qui ressort de l'interféromètre imageur après avoir traversé la sonde en sens inverse. Le spectre de cette lumière est la superposition des deux spectres cannelés contrôleur et imageur venant des deux interféromètres :

$$S_{détecté}(\sigma) = S_{image}(\sigma) \sim S(\sigma) (1 + C_c \cos(2\pi\delta_{contrôle} \sigma))(1 + C_i \cos(2\pi\delta_{image} \sigma)) \quad (4.3)$$

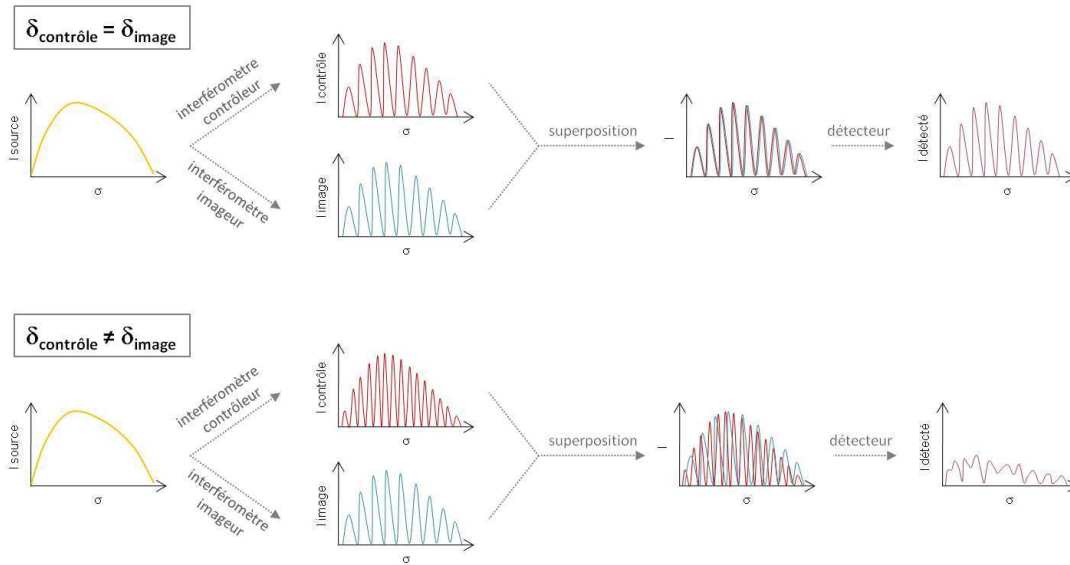


Figure 4.3 – Spectres cannelés créés par les deux interféromètres et spectre résultant sur le détecteur, pour des différences de marche de contrôle et d'imagerie égales (haut) et différentes (bas) (représentation schématique).

Le détecteur intègre ensuite ce spectre sur tous les nombres d'onde et en sort un signal. Si les fréquences des cannelures du spectre contrôleur et du spectre imageur correspondent, i.e. si les différences de marche sont égales, il y a une superposition parfaite des spectres

cannelés, ce qui permet d'obtenir un signal maximum après intégration sur les nombres d'ondes. Si les fréquences des cannelures ne correspondent pas, la superposition est mauvaise, et le signal résultant est faible, ce qui est illustré sur la figure 4.3.

La figure 4.4 présente un exemple de signal obtenu sur un objet simple, un miroir placé devant la sonde, lorsque l'on balaye la différence de marche de l'interféromètre contrôleur. On voit qu'il y a un pic de signal lorsque la différence de marche de l'interféromètre contrôleur est égale à celle de l'interféromètre imageur.

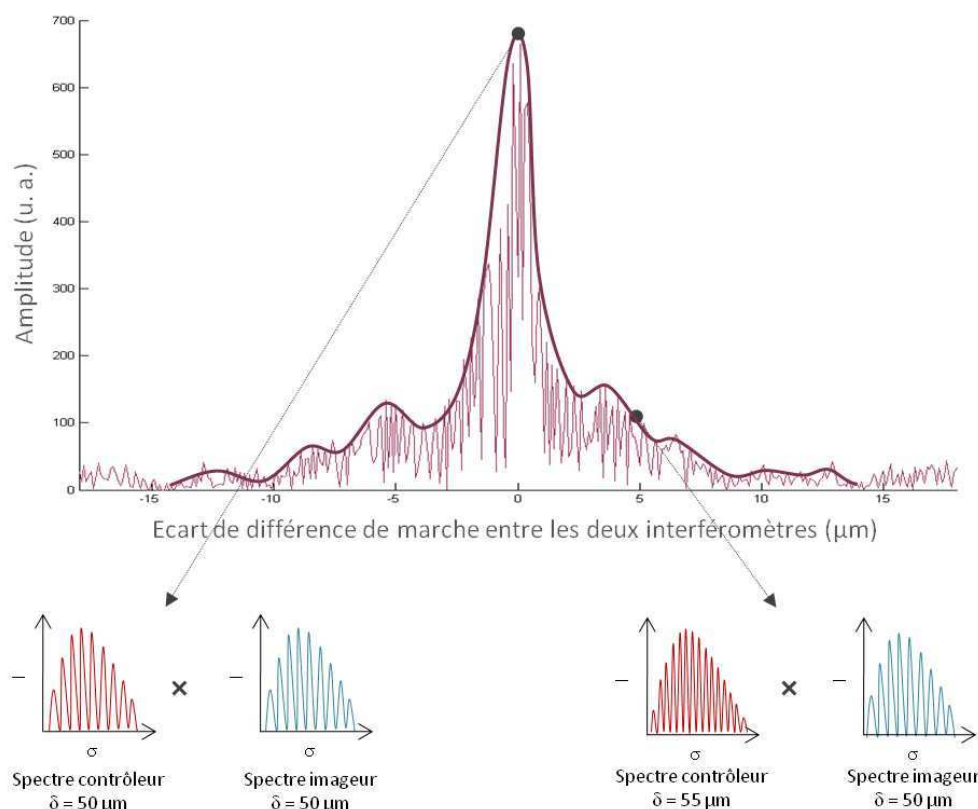


Figure 4.4 – Signal OCT à deux interféromètres couplés : interférogramme obtenu expérimentalement sur une surface réfléchissante située à 25 μm en amont de la sonde dans l'air, et tracé indicatif de l'enveloppe.

Notons que si l'objet est simple, comme un miroir, il n'y a de lumière réfléchie qu'à une unique différence de marche, et donc une seule fréquence de cannelure est créée dans le spectre imageur. Si par contre l'objet est complexe, comme un tissu biologique, il y a un signal rétrodiffusé à chaque profondeur, donc à différentes différences de marche, et différentes fréquences de cannelure sont créées dans le spectre imageur. En balayant la différence de marche de contrôle on fait alors ressortir un pic de signal à chaque profondeur de rétrodiffusion, dont l'amplitude est proportionnelle à celle du signal de rétrodiffusion : on reconstruit ainsi le profil axial de l'objet.

En résumé, en définissant la différence de marche de contrôle on définit une différence de marche d'imagerie correspondante, c'est-à-dire une profondeur d'imagerie dans un plan 'en face' perpendiculaire à l'axe optique. Sur le détecteur 2D on a donc une image 'en face' d'OCT Plein Champ.

4.1.3 Détails du montage expérimental de FFOCT

A ce jour, seuls deux systèmes de FFOCT endoscopique ont déjà été proposés, les deux basés sur le principe présenté ici, mais leurs performances ne permettent pas une imagerie biomédicale *in vivo* et *in situ*.

Un premier système proposé en 2006 utilise une source de lumière temporellement et spatialement incohérente (lampe à arc au Xénon), un interféromètre contrôleur de Michelson, un interféromètre imageur de Linnik [109]. Il a démontré des performances d'imagerie *ex vivo* correctes, cependant l'interféromètre imageur impose un encombrement trop important à l'extrémité distale de la sonde, ce qui rend impossible sa miniaturisation et donc son utilisation *in situ*.

Un deuxième système proposé en 2007 utilise une source de lumière temporellement incohérente mais spatialement cohérente (SLD), un interféromètre contrôleur de Michelson, un interféromètre imageur simple dit à 'chemin commun' ('common-path') [110]. La sonde est ainsi très simple de conception et peut être miniaturisée. Cependant l'appareil obtient une sensibilité autour de -60 dB, sans doute limitée par la diaphonie ('cross-talk') due à la cohérence spatiale de la source [111]. Cette sensibilité est insuffisante pour l'imagerie des tissus biologiques.

Dans les systèmes que nous allons proposer ici, nous nous attachons à utiliser une source de lumière qui soit incohérente à la fois temporellement et spatialement. En effet, comme nous l'expliquerons plus en détail par la suite, l'incohérence temporelle garantit une bonne résolution axiale, typiquement 1 μm , tandis que l'incohérence spatiale augmente la sensibilité du système en réduisant les effets de diaphonie ('cross-talk'). De plus, l'interféromètre imageur est toujours très simple : une cavité optique de type Fizeau à chemin commun, utilisant comme simple faisceau de référence une réflexion générée à une interface au bout de la sonde. Ainsi il n'y a pas de contraintes sur le diamètre de la sonde.

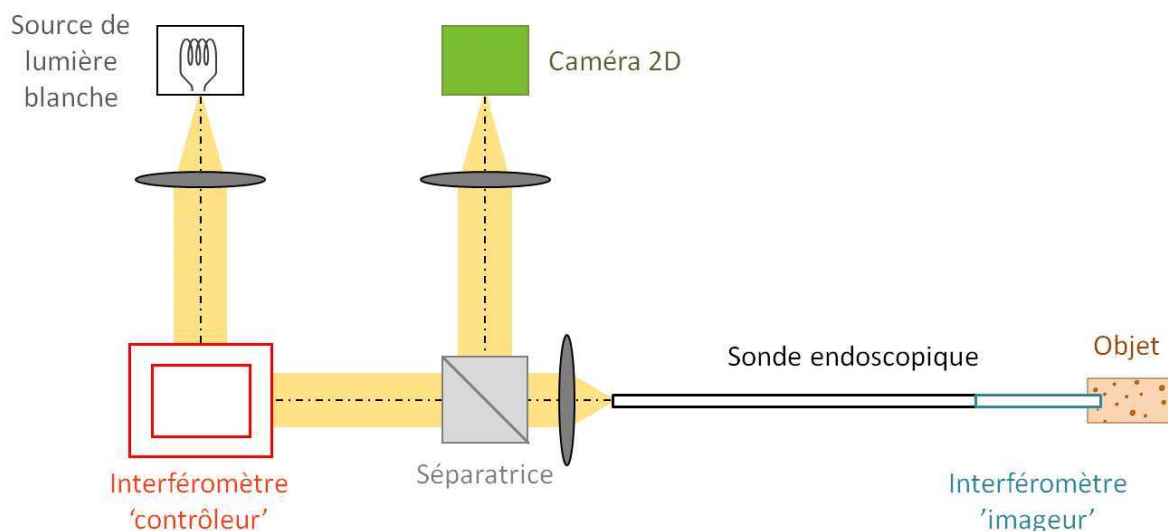


Figure 4.5 – Montage d'OCT Plein Champ endoscopique avec deux interféromètres couplés.

Notre système est présenté sur la figure 4.5. Nous allons présenter ici les caractéristiques principales, mais il sera expliqué plus en détail au chapitre 6.

La source de lumière blanche incohérente est une lampe à arc au Xénon. Son spectre n'est pas aussi lisse que ceux des sources souvent utilisées en FFOCT (halogènes, LEDs) mais sa puissance optique et sa luminance sont bien supérieures.

Elle illumine l'interféromètre contrôleur qui est de type Michelson (voir page 2.3.1), avec une séparatrice divisant le faisceau d'illumination en deux faisceaux d'amplitudes égales qui se réfléchissent sur deux miroirs.

La lumière en sortie de l'interféromètre contrôleur est injectée dans la sonde, constituée d'un faisceau de fibres optiques, typiquement 30 000 fibres pour un diamètre inférieur à 1 mm, et éventuellement d'une lentille GRIN à l'extrémité distale pour focaliser la lumière à une distance donnée.

L'interféromètre imageur est une cavité optique formée par un faisceau de référence réfléchi à la surface de la lentille (ou du faisceau) et un faisceau objet à chaque profondeur de rétrodiffusion, comme illustré sur la figure 4.6. Cet interféromètre est dit à 'chemin commun' car les faisceaux de référence et objet parcourent exactement le même chemin ensemble dans la sonde, à l'aller comme au retour, et le seul trajet qui n'est pas parcouru par les deux faisceaux est celui qui donne la différence de marche.

La lumière en sortie de l'interféromètre imageur est transportée par la sonde en sens inverse. Une séparatrice permet de la rediriger sur le détecteur via une lentille de focalisation. Le détecteur 2D est une caméra de type CCD ou CMOS, dont le capteur peut typiquement avoir 1 Mégapixel.

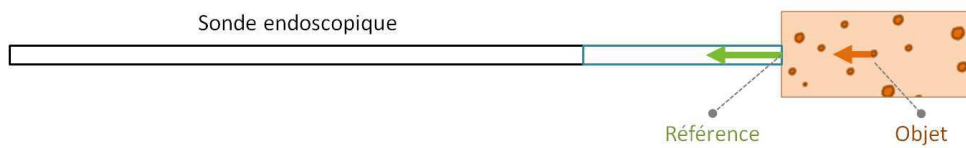


Figure 4.6 – Détail de l'interféromètre imageur.

4.2 Performances du système

4.2.1 Résolutions transversale et axiale

Résolution transversale

La résolution transversale de l'appareil dépend de plusieurs paramètres : les composants optiques en bout de sonde (lentilles GRIN), l'échantillonnage sur le capteur de la caméra, les caractéristiques du faisceau de fibre.

Les lentilles définissent la résolution minimale atteignable par le système, qui dépend de leur ouverture numérique (comme expliqué en 2.2.1 page 14). A une longueur d'onde de 800 nm, pour une ouverture de 0.1 on a $R_{min}=4.8 \mu\text{m}$, à 0.2 $R_{min}=2.4 \mu\text{m}$, et à 0.3 $R_{min}=1.6 \mu\text{m}$.

Le capteur de la caméra est une matrice bidimensionnelle de pixels qui réalise un échantillonnage spatial discret de l'image. Le théorème de Shannon, classique en traitement du signal, nous dit que pour reconstruire un signal de fréquence ν_s correctement il faut

l'échantillonner à une fréquence au moins double : $\nu_{ech} = 2 \nu_s$. En transposant ce principe général à notre situation, cela veut dire que pour avoir une résolution sur l'image finale de $x \mu\text{m}$, il faut en termes de grandissement que $x \mu\text{m}$ de l'objet représentent au moins 2 pixels du détecteur. La taille du détecteur étant limitée (les capteurs sont souvent carrés et ont typiquement 1024×1024 pixels) on voit par ailleurs qu'il y a tout de suite un compromis entre champ de vue et résolution. Plus précisément :

$$R_{min} = \frac{2 FOV}{N} \quad (4.4)$$

avec FOV le champ de l'image ('Field Of View'), et N le nombre de pixels du détecteur dans une direction (si le détecteur n'est pas carré il faut considérer chaque direction x ou y ainsi que les résolutions correspondantes indépendamment). Pour une caméra avec 1024×1024 pixels, une résolution de $2 \mu\text{m}$ donne un champ maximum de $1 \times 1 \text{ mm}$, et une résolution de $5 \mu\text{m}$ un champ maximum de $2.5 \times 2.5 \text{ mm}$. On choisit ces paramètres en modifiant le grandissement sur la caméra, c'est-à-dire les optiques de focalisation.

Le faisceau de fibres apporte de plus un effet de pixélisation qui peut dégrader la résolution. Après passage de l'image dans le faisceau, un coeur de fibre porte un pixel de l'image, au sens d'une unité d'information de l'image, tandis qu'il représente lui-même plusieurs pixels sur la caméra, comme on peut le voir sur la figure 4.7. Cela revient donc à réduire le nombre de pixels effectifs sur l'image finale, et à introduire une fréquence d'échantillonnage supplémentaire égale à la distance entre coeurs adjacents du faisceau (en supposant un système optique de lentilles de grandissement 1, sinon il faut diviser par le grandissement). Typiquement pour un faisceau de 30 000 fibres, de diamètre $< 1 \text{ mm}$, le diamètre d'un coeur est autour de $2 \mu\text{m}$ et la distance intercoeurs autour de $3.5 \mu\text{m}$.

Au final on peut ainsi avoir une résolution transversale de l'ordre de quelques micromètres, si on l'utilise directement ou avec un système optique de grandissement 1.

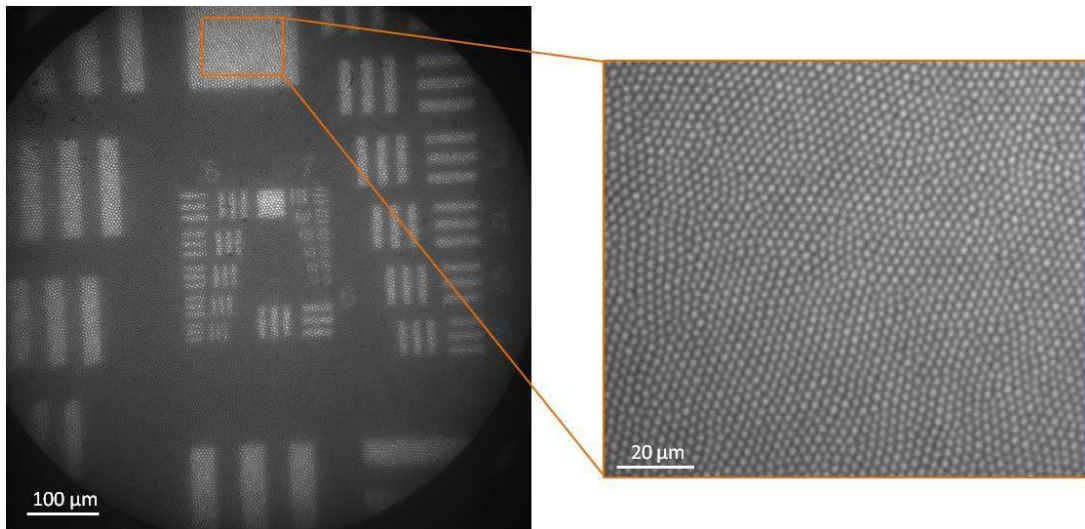


Figure 4.7 – Image d'une mire de résolution (USAF 1951 target, Edmund Optics) en réflexion à travers un faisceau de fibres de 30 000 coeurs (IGN 08/30, Sumitomo), et détail des coeurs de fibres.

Résolution axiale

Nous avons vu le principe de sélection de la profondeur d'imagerie via la superposition des signaux interférométriques contrôleur et imageur, et le spectre résultant à l'équation 4.3. Il n'existe pas de solution analytique à cette équation qui nous permettrait d'obtenir une expression simple de la résolution axiale du système. Cependant on peut calculer de manière numérique le signal résultant pour différents paramètres et en déduire la résolution axiale, comme montré sur la figure 4.8.

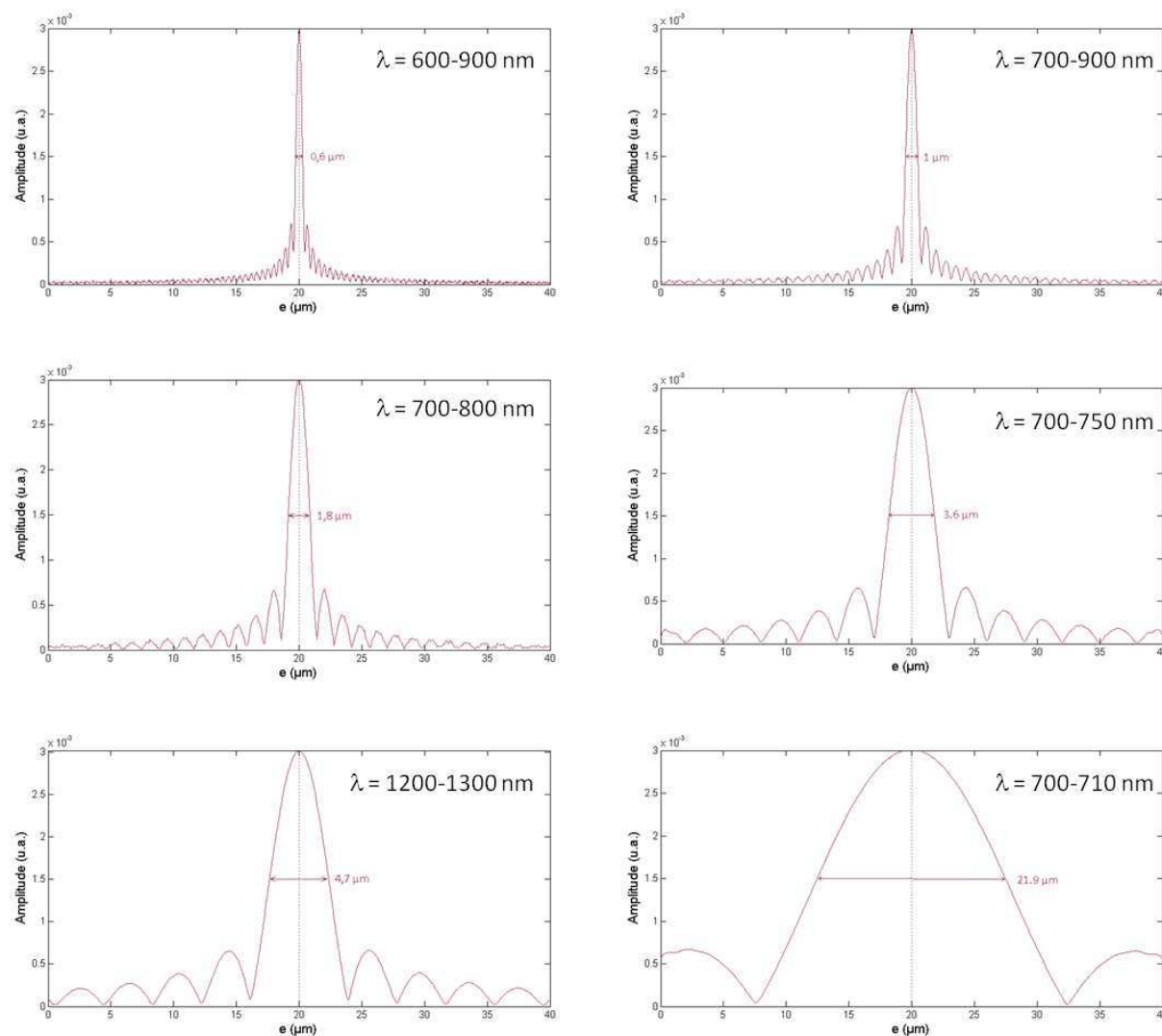


Figure 4.8 – Signal OCT à deux interféromètres couplés calculé pour différentes gammes de longueurs d'onde, tracé en fonction de l'écart e entre les différences de marche de contrôleur et d'imagerie.

On constate que plus le spectre de la source est large, meilleure est la résolution, comme en OCT classique. On peut comprendre cela de manière intuitive en considérant qu'un spectre large améliore l'efficacité de la superposition des spectres cannelés : plus il y a de nombres d'onde mieux on voit le brouillage des spectres dès qu'on s'éloigne de la zone de superposition. Cela rejoint le concept de cohérence temporelle : plus il y a de nombres d'onde plus les signaux d'interférences venant de chaque nombre d'onde se brouillent vite

dès qu'on s'éloigne de la différence de marche nulle.

Typiquement, pour un système travaillant dans une gamme de longueurs d'onde entre 700 et 900 nm, on obtient une résolution axiale autour de 1 μm , ce qui est une performance comparable à la FFOCT classique.

4.2.2 Amélioration de la sensibilité

Comme en FFOCT classique, on peut améliorer le rapport signal-sur-bruit en extrayant le signal interférométrique faible du fond incohérent. Pour cela on utilise la méthode de modulation de phase présentée en 2.3.2 page 23, à deux phases ou à quatre phases. On introduit dans l'interféromètre contrôleur un élément de réglage fin de la différence de marche, comme un piézoélectrique, de manière à pouvoir la modifier d'une quantité δ_ϕ de l'ordre d'une fraction de la longueur d'onde. Notons que cette modulation peut aussi être effectuée au niveau de l'interféromètre imageur, cependant cela demanderait l'ajout d'éléments mobiles à ce niveau et augmenterait la complexité de la sonde.

En modulation à deux phases, le détecteur enregistre une première image I_1 à $\delta_\phi=0$:

$$I_1(\sigma) \sim (1 + C_c \cos(2\pi\delta_{\text{contrôle}} \sigma))(1 + C_i \cos(2\pi\delta_{\text{image}} \sigma)) \quad (4.5)$$

Puis le détecteur enregistre une deuxième image en opposition de phase I_2 à $\delta_\phi=\lambda/2=2/\sigma$:

$$I_2(\sigma) \sim (1 + C_c \cos(2\pi(\delta_{\text{contrôle}} + 2/\sigma) \sigma))(1 + C_i \cos(2\pi\delta_{\text{image}} \sigma)) \quad (4.6)$$

soit :

$$I_2(\sigma) \sim (1 - C_c \cos(2\pi\delta_{\text{contrôle}} \sigma))(1 + C_i \cos(2\pi\delta_{\text{image}} \sigma)) \quad (4.7)$$

La différence $I=I_1-I_2$ permet de faire ressortir le signal d'interférence C_i à la différence de marche de contrôle :

$$I(\sigma) \sim \cos(2\pi\delta_{\text{contrôle}} \sigma)(1 + C_i \cos(2\pi\delta_{\text{image}} \sigma)) \quad (4.8)$$

Un calcul des spectres ainsi obtenus est présenté sur la figure 4.9.

Compte tenu du caractère aléatoire de la phase des signaux rétrodiffusés, ce qui donne une allure de speckle aux images (voir annexe A), et pour des raisons de vitesse d'acquisition, nous nous sommes limités à l'acquisition en 2 phases plutôt que 4 phases.

4.2.3 Conclusion

Nous avons présenté le principe d'un système d'imagerie par FFOCT intégrant un faisceau de fibres pour l'endoscopie flexible. Il est basé sur l'utilisation de deux interféromètres de manière à garder le faisceau de fibres totalement passif et insensible aux perturbations de l'environnement. Ce système peut être implémenté de multiples façons (sélection des composants, des interféromètres, des longueurs d'ondes), nous avons déjà effectué certains choix essentiels pour les systèmes que nous voulons développer, à savoir garder une source incohérente, et un interféromètre imageur passif.

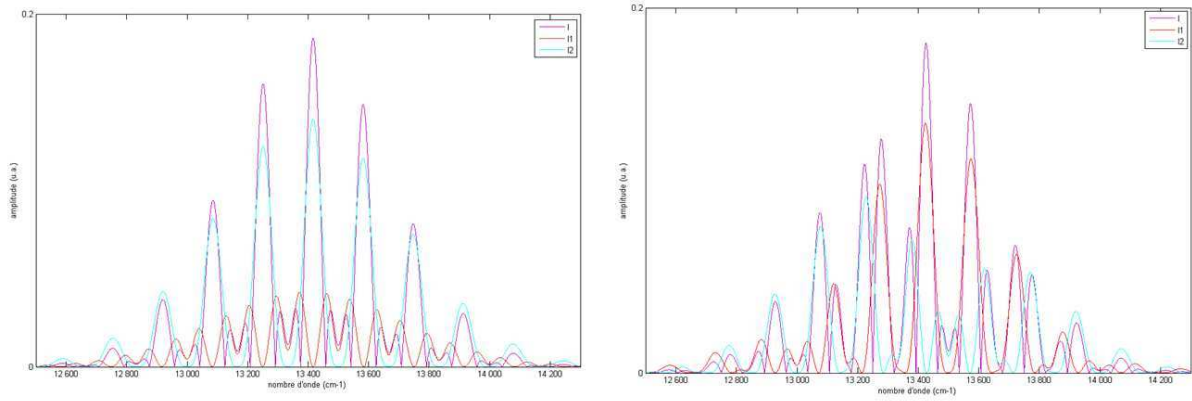


Figure 4.9 – Spectres reçus par le détecteur (superposition des spectres cannelés de contrôle et d'imagerie) : I_1 à $\delta_\phi=0$, I_2 à $\delta_\phi=2/\sigma$, et $I=I_1-I_2$ (calculs numériques). La différence de marche objet est $\delta_{image} = 60 \mu\text{m}$, la différence de marche de contrôle est fixée à $\delta_{contrôle} = 60 \mu\text{m}$ (gauche) et à $\delta_{contrôle} = 70 \mu\text{m}$ (droite).

Nous allons voir différentes implémentations de cette technique dans les chapitres suivants, les problèmes et phénomènes parasites qui peuvent survenir, et les solutions que nous y proposons.

Problématiques et phénomènes optiques d'auto-interférences

Table des matières

5.1	Implémentation simple du système	58
5.2	Phénomène de modulation d'intensité	60
5.2.1	Observation d'une image 'fantôme'	60
5.2.2	Interprétation : modulation de phase et d'intensité	60
5.2.3	Solutions possibles	61
5.3	Phénomènes d'auto-interférences	62
5.3.1	Observation d'un signal parasite	62
5.3.2	Interprétation de l'origine du signal par les phénomènes d'auto-interférences	66
5.3.3	Solutions proposées	69

Le système de FFOCT à deux interféromètres présenté au chapitre 4 peut être mis en oeuvre assez simplement d'un point de vue technique. Cependant certaines difficultés surgissent lors de l'implémentation du montage, notamment au cours de la propagation de la lumière dans le faisceau de fibres qui produit un signal interférométrique parasite. Nous allons présenter ici une première implémentation simple du système, et la découverte de phénomènes optiques qui ajoute un signal 'parasite' à l'image. Nous allons tâcher de comprendre ces phénomènes, et de proposer des solutions pour s'en affranchir.

5.1 Implémentation simple du système

Une première implémentation simple du système est illustrée sur la figure 5.1. Un système plus complet sera présenté au chapitre 6.

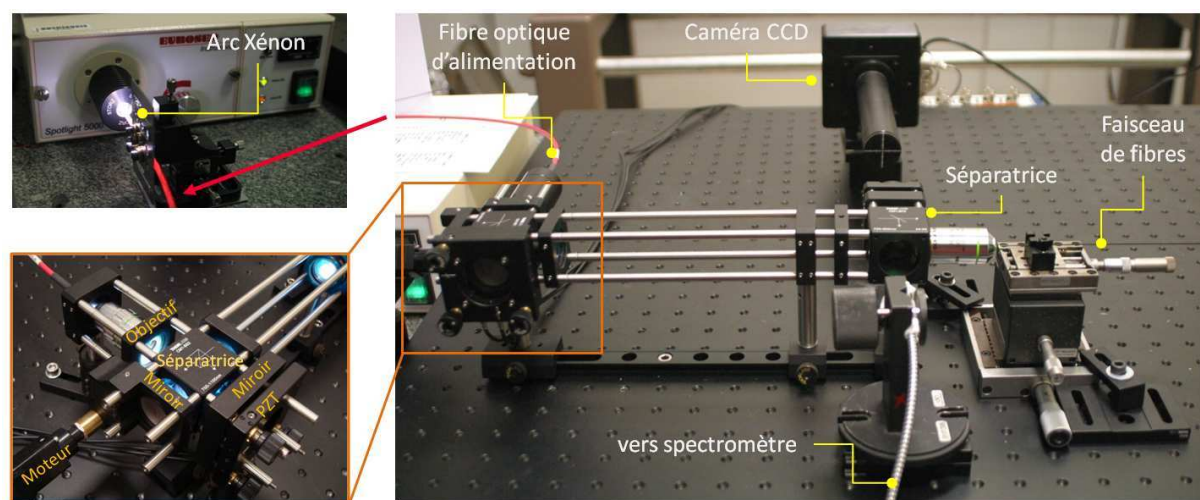


Figure 5.1 – Montage de FFOCT à deux interféromètres avec faisceau de fibres, détail de la source couplée à une fibre optique, et de l'interféromètre contrôleur de Michelson.

Nous utilisons une source à arc à miroir ellipsoïdal au Xénon (Spotlight 5310, Eurosep) couplée dans une fibre optique (diamètre 0.9 mm, NA 0.22) placée au foyer de l'ellipsoïde de manière à récupérer le maximum de lumière. La fibre doit alors être dénudée jusqu'au coeur sur plusieurs centimètres car la gaine, trop fragile, ne supporte pas la chaleur dégagée et fond immédiatement. La fibre illumine ensuite l'interféromètre contrôleur via un objectif de microscope d'illumination (x20, NA 0.4, Olympus).

L'interféromètre contrôleur est un interféromètre de Michelson en version compacte, avec une membrane séparatrice (CM1-BP2, Thorlabs) et deux miroirs en argent totalement réfléchissants (ME1-P01, Thorlabs). L'un des miroirs est porté par un moteur (T-NA08A25, Zaber) qui permet de régler la différence de marche de l'interféromètre

par pas de 20 nm. L'autre miroir est monté sur une translation piézoélectrique à 3 axes (KC1-PZ, Thorlabs) gérés indépendamment par un contrôleur (MDT693A, Thorlabs), de manière à réaliser la modulation de phase tout en permettant également un mouvement très fin de l'orientation du miroir, indispensable au bon réglage de l'interféromètre.

En sortie la lumière passe par un système afocal, composé de deux lentilles, qui conjugue les pupilles des objectifs d'illumination et d'injection, et par deux filtres de manière à travailler avec les longueurs d'onde comprises entre 600 et 1000 nm. Une membrane séparatrice envoie la lumière dans la sonde via un objectif de microscope d'injection (x20, NA 0.4, Olympus). Un spectromètre placé de l'autre côté de la séparatrice permet de vérifier la qualité du spectre cannelé contrôleur (CCS175, Thorlabs) pour, le cas échéant, re-régler l'interféromètre contrôleur.

La sonde est un faisceau de 30 000 fibres optiques de diamètre extérieur 0.9 mm et intérieur 0.8 mm, NA 0.35 (IGN 08/30, Sumitomo). Chaque coeur à un diamètre de 1.9 μm , la distance inter-fibres moyenne est de 3.5 μm .

La lumière en sortie de l'interféromètre imageur est redirigée par la séparatrice sur le détecteur via un doublet de focalisation. Le détecteur est ici une caméra CCD de 1024*1024 pixels à 60 Hz (1M60, Dalsa).

La synchronisation des différents composants est effectuée sur l'ordinateur par un programme personnalisé sous LabView, précédemment développé pour le montage de FFOCT classique et légèrement modifié pour ce montage. Ce programme affiche l'image directe captée par le détecteur, et l'image tomographique calculée après normalisation et modulation de phase (décrite au chapitre 4). En effet les deux images I_1 et I_2 sont normalisées avant d'être soustraites de manière à corriger d'éventuelles fluctuations dans l'intensité de l'éclairage.

Pour imager, on place simplement l'échantillon à l'extrémité distale de la sonde. La figure 5.2 montre un exemple de franges d'interférence enregistrées sur un échantillon cohérent (surface réfléchissante plane) placé à 20 μm devant la sonde.

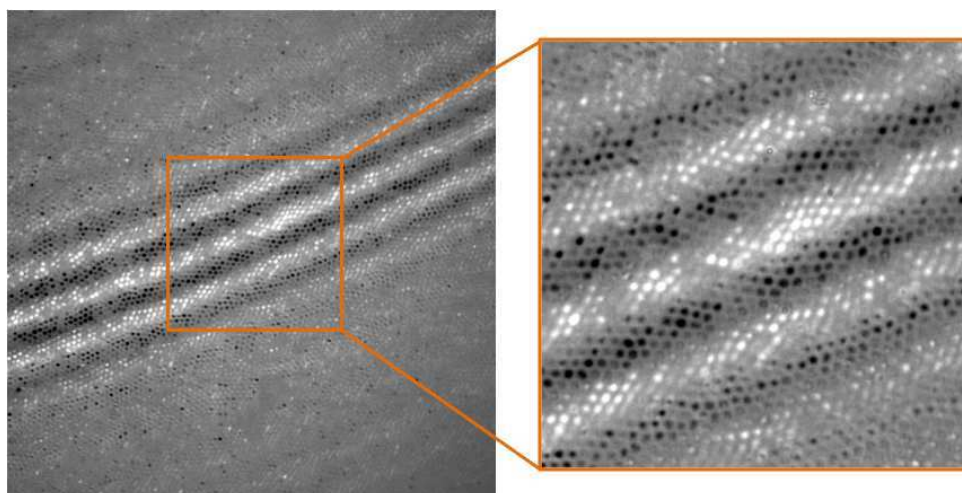


Figure 5.2 – Franges d'interférences enregistrées par la caméra en présence d'une surface plane de verre placée dans l'air à 20 μm devant le bout de la sonde.

5.2 Phénomène de modulation d'intensité

5.2.1 Observation d'une image 'fantôme'

En l'absence d'échantillon, la caméra ne devrait pas détecter de signal et seulement afficher le bruit résiduel, principalement le bruit de fond ambiant et le bruit de la caméra. Cependant, au lieu d'une image noire on observe une sorte d'image 'fantôme' ressemblant à des franges, dont on peut voir des exemples figure 5.3. Le motif de cette image ne change pas quand on balaye la différence de marche de contrôle, mais son contraste diminue.

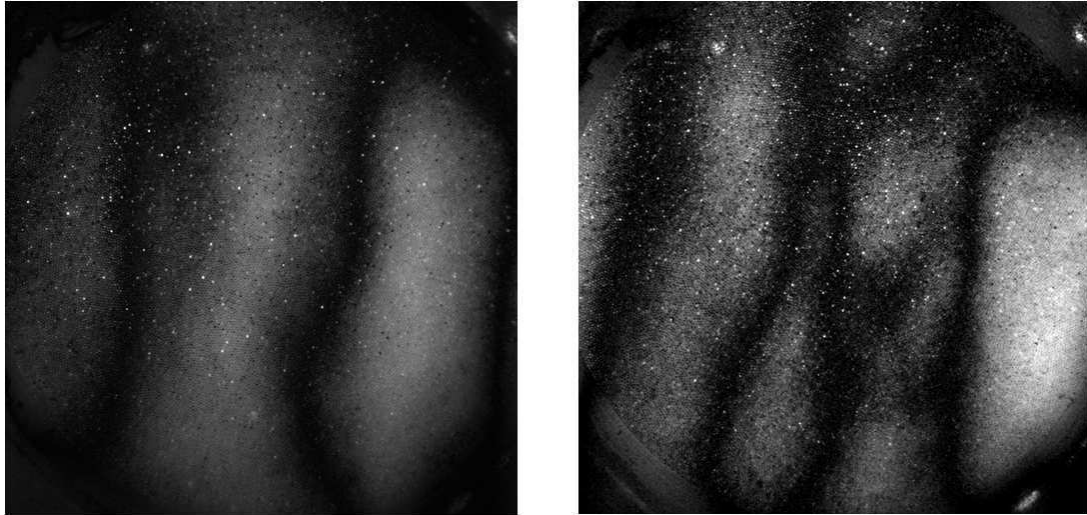


Figure 5.3 – Images pouvant être observées sur la caméra en l'absence d'échantillon, l'extrémité de la sonde étant dans l'air libre, à une différence de marche de contrôle de 20 μm .

5.2.2 Interprétation : modulation de phase et d'intensité

Observation de l'hétérogénéité des spectres cannelés dans le champ

Le montage est réalisé de telle sorte qu'on peut avoir accès au faisceau avant son entrée dans la sonde, le champ observé est présenté sur la figure 5.4. On s'aperçoit alors que, même en réglant l'interféromètre de Michelson au mieux, la lumière en sortie de celui-ci présente différentes couleurs dans le champ de vue xy et non la teinte homogène attendue (appelée 'teinte plate'). La couleur perçue, qui résulte du spectre cannelé comme expliqué en annexe B, est directement liée à la différence de marche de l'interféromètre selon l'échelle de référence de Newton (figure 5.4). Cela signifie donc que le spectre en sortie de l'interféromètre n'est pas homogène dans le plan xy . Évaluée quantitativement à partir des couleurs, la différence de marche entre deux points du champ peut varier jusqu'à 1 μm , ce qui est une valeur élevée quand on travaille avec des différences de marche comprises entre 0 et 200 μm .

Hétérogénéité des intensités des spectres cannelés

De cette hétérogénéité spectrale découle une hétérogénéité d'intensité. En effet, théoriquement chaque spectre cannelé représente la moitié de l'intensité du spectre d'entrée de

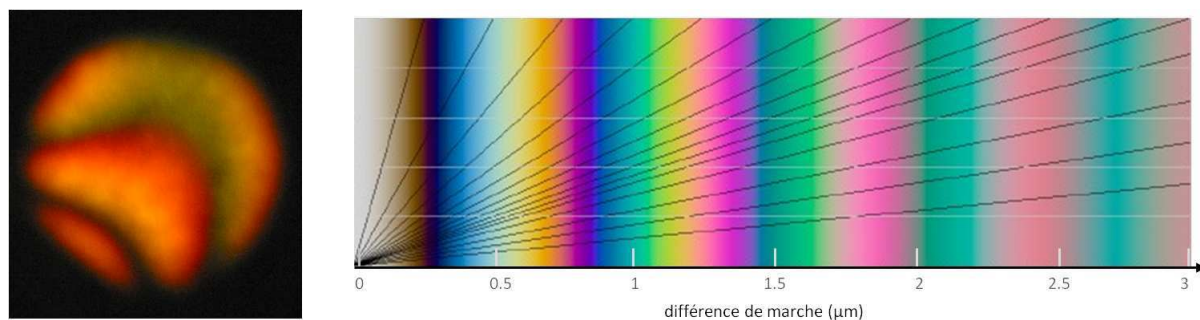


Figure 5.4 – Couleurs observées sur le montage dans le champ en sortie d'interféromètre contrôleur, et échelle de référence des teintes de Newton.

l'interféromètre. Cela est vrai pour un spectre lisse, comme une Gaussienne, mais ici le spectre est celui de l'arc au Xénon qui comprend de nombreux pics très intenses et assez fins, notamment au-dessus de 800 nm. Pour différents spectres cannelés à différentes fréquences, les franges du spectre n'échantillonnent pas les pics de la même manière, comme illustré sur la figure 5.5. Donc deux spectres cannelés peuvent avoir des intensités totales différentes, même si l'écart entre leurs différences de marche est faible.

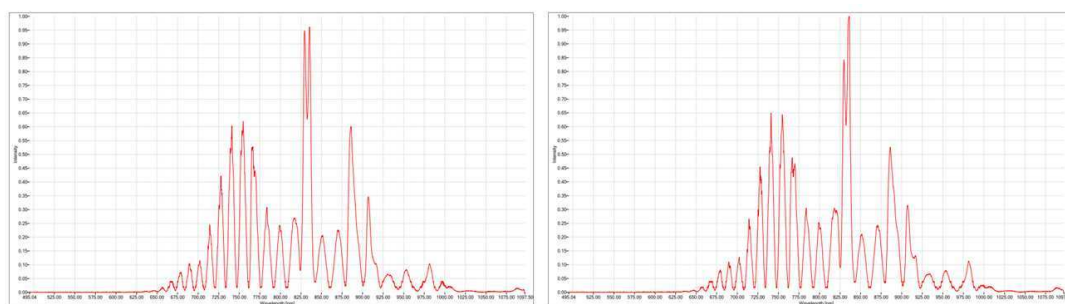


Figure 5.5 – Spectres cannelés mesurés en sortie de l'interféromètre contrôleur.

Les images directes I_1 et I_2 sont renormalisées avant d'être soustraites pour afficher l'image tomographique finale, cependant cette normalisation est effectuée sur la moyenne et ne peut donc pas corriger les fluctuations d'intensité pixel à pixel. Il y a donc une modulation d'intensité en même temps que de phase. Après soustraction, il reste donc une image 'fantôme' qui est le reflet de la distribution des différences de marche dans le champ.

5.2.3 Solutions possibles

Il y a plusieurs niveaux sur lesquels on peut agir : soit corriger les hétérogénéités spectrales, soit corriger les hétérogénéités d'intensité.

Hétérogénéité spectrale

Nous pensons que l'impossibilité à atteindre une teinte plate de qualité suffisante avec l'interféromètre de Michelson est due à la qualité insuffisante du surfaçage de la séparatrice. Ici nous avons utilisé une séparatrice dont la surface est garantie plane à $\lambda/2$ près,

ce qui, en comptant l'aller-retour dans l'air effectué par le faisceau, peut induire des écarts de différences de marche de l'ordre de λ , soit un peu moins de $1\ \mu\text{m}$. Cette valeur est cohérente avec notre observation des couleurs. Cependant même les meilleurs séparatrices disponibles dans le commerce présentent des défauts de planéité d'au moins $\lambda/10$, qu'elles soient à membrane ou en cube. Cela donne des écarts de différence de marche de l'ordre de 100 nm, ce qui est toujours trop important ici.

Hétérogénéité d'intensité

On peut normaliser les images pixel à pixel plutôt que par la moyenne globale : $\frac{I_1(x,y)-I_2(x,y)}{I_1(x,y)+I_2(x,y)}$ au lieu de $\frac{I_1(x,y)-I_2(x,y)}{I_{\text{moy}}}$. Cependant nous avons constaté que ce procédé est très sensible au bruit et produit alors des pixels aberrants dans l'image.

Si le spectre de la source était lisse, les hétérogénéités spectrales ne produiraient pas d'hétérogénéités d'intensité. Cependant il n'existe pas d'autre source de lumière temporellement et spatialement incohérente assez puissante à ce jour pour remplacer l'arc au Xénon. On peut tout de même utiliser des filtres de manière à n'utiliser qu'une bande de longueur d'onde où il y a moins de pics. On décide par la suite de se placer entre 700 et 800 nm.

Enfin, nous avons vu que la modulation d'intensité est due au mauvais échantillonnage des pics par les franges du spectre cannelé. Plus la fréquence des franges augmente, meilleur est l'échantillonnage. En conséquence, plus on travaillera à des différences de marche élevées, moins ce phénomène parasite sera présent. Nous reparlerons plus en détails dans la suite d'un mode de fonctionnement du système à grandes différences de marches.

5.3 Phénomènes d'auto-interférences

5.3.1 Observation d'un signal parasite

Apparition d'un signal inconnu

L'image 'fantôme' de modulation d'intensité n'est pas le seul signal inattendu qui apparaîtrait sur la caméra en l'absence d'échantillon. Comme on l'a peut-être déjà remarqué sur les figures 5.2 ou 5.3, et comme on peut le voir clairement sur la figure 5.6, certains coeurs présentent un signal fort sur l'image tomographique. On peut estimer qu'environ 3 % des fibres du faisceau sont ainsi 'allumées'. Les valeurs peuvent être très élevées : jusqu'à 25% de l'image directe. En comparaison, les franges de la figure 5.2, obtenues sur un objet à l'interface air-verre, ont également une valeur de 25%.

Comportement du signal

Nous avons remarqué que ce signal reste très stable dans le temps, au bruit près, pour une configuration du faisceau donnée. On détecte véritablement un signal supplémentaire et non un bruit, en particulier sa moyenne temporelle n'est pas nulle.

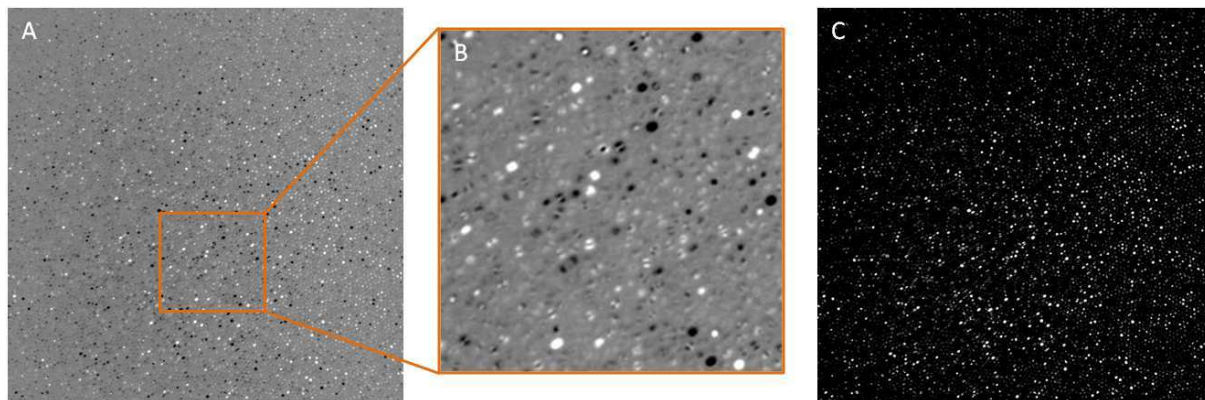


Figure 5.6 – Images enregistrées par la caméra en l'absence d'échantillon : on voit le signal parasite seul, en valeurs négatives/positives (après modulation de phase) (A)(B) et en valeur absolue (C).

Il est modifié par les mouvements ou contraintes qu'on peut faire subir au faisceau de fibres.

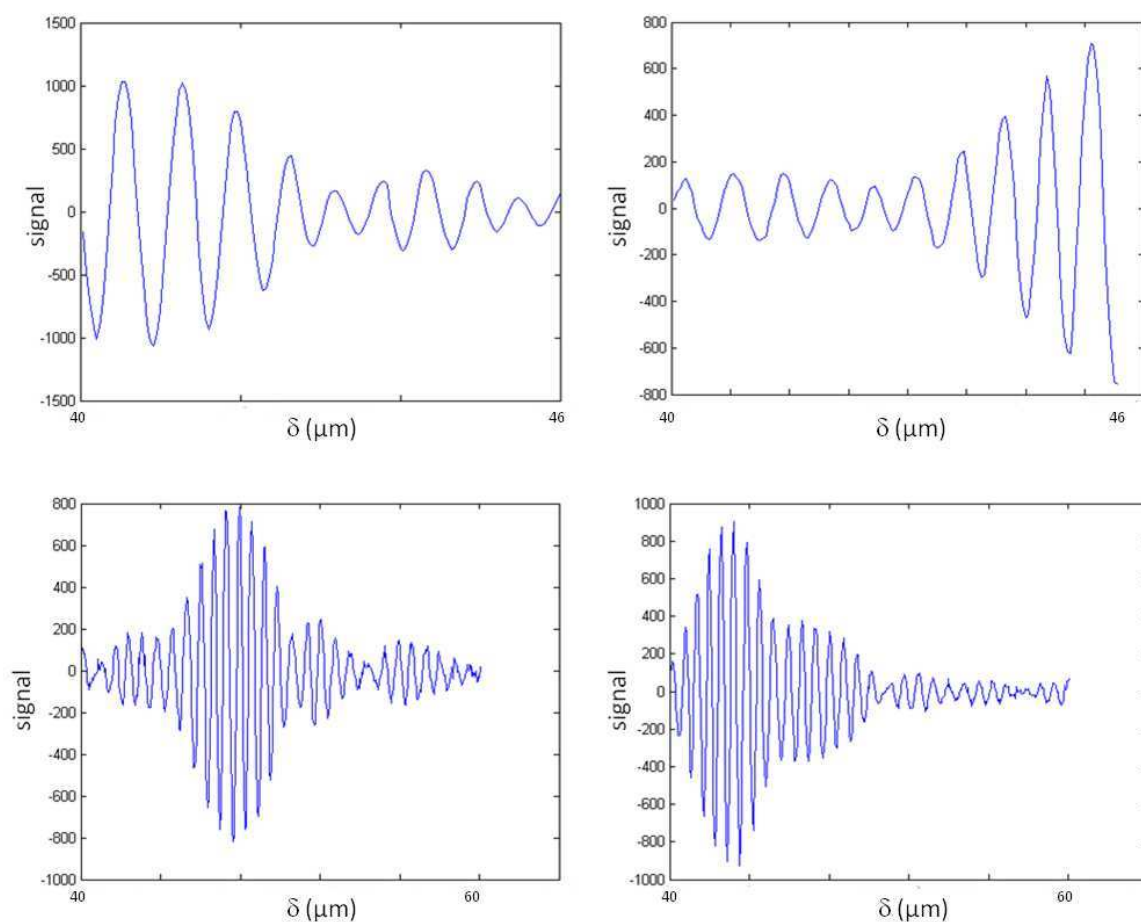


Figure 5.7 – Suivi des signaux parasites de 4 fibres du faisceau en balayant la différence de marche de contrôle par pas de 40 nm sur 6 μm (haut) et sur 20 μm (bas).

Il est surtout dépendant de la différence de marche de contrôle δ_c qui est injectée dans les fibres. La figure 5.7 présentent les signaux obtenus sur 4 coeurs allumés en balayant δ_c

par pas de 40 nm sur quelques μm . On observe un signal clairement sinusoïdal de période environ 700 nm. L'enveloppe de la sinusoïde présente un maximum autour des δ_c pour lesquels on observe l'allumage du coeur en question.

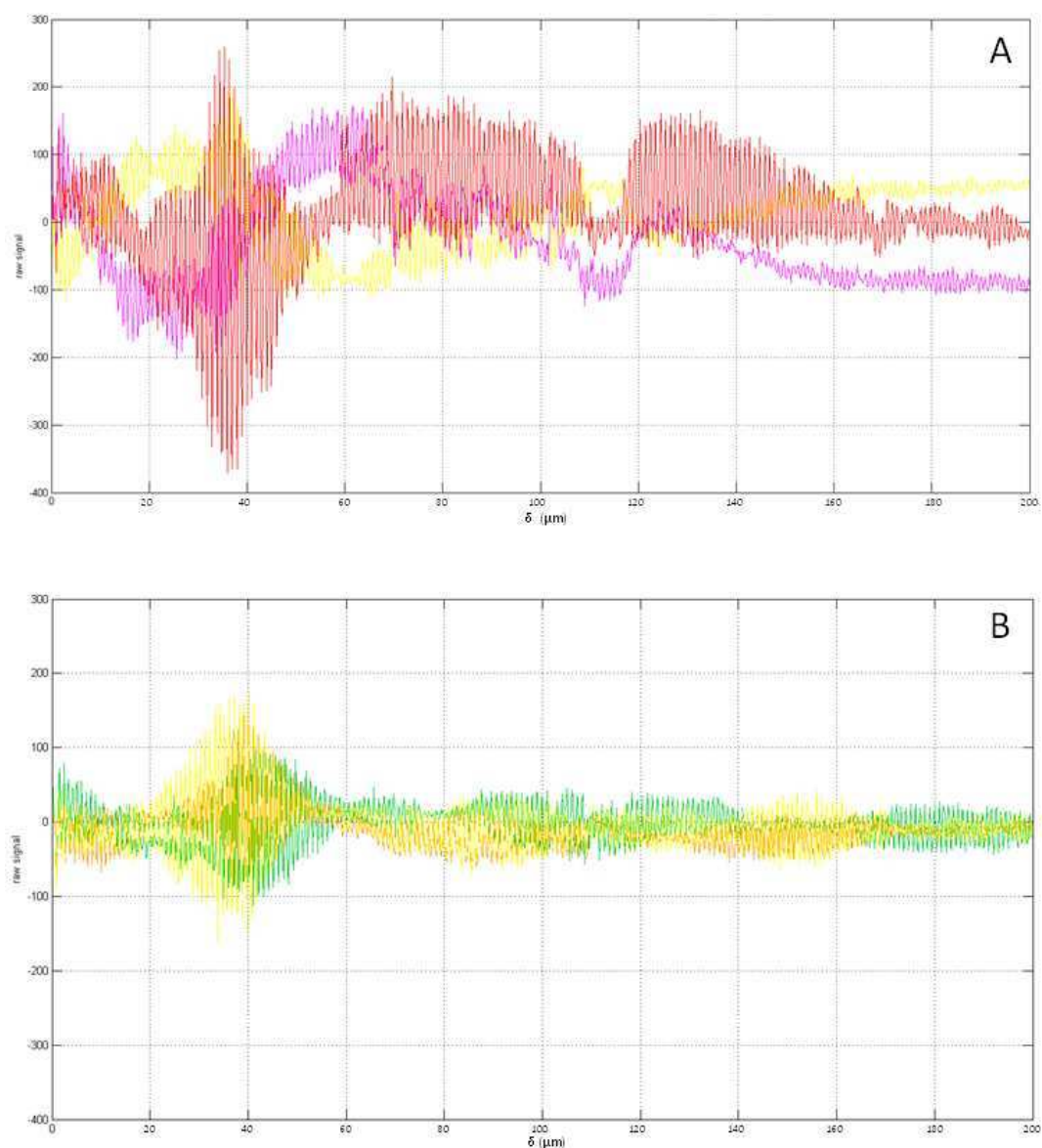


Figure 5.8 – Suivi des signaux parasites de 6 fibres du faisceau en balayant la différence de marche de contrôle par pas de 200 nm sur 200 μm . Les fibres jaune et rose (graphe A) sont des fibres situées de manière adjacente dans le faisceau.

Sur la figure 5.8 on suit cette fois-ci plusieurs coeurs pour des différences de marche de 0 à 200 μm par pas de 200 nm. On retrouve toujours une variation sinusoïdale, modulée par une enveloppe dont la forme varie très fortement d'une fibre à l'autre. On trouve différents comportements suivant les fibres. Certaines s'allument une seule fois (graphe B) à leur valeur maximale tandis que d'autres présentent plusieurs maxima locaux (graphe A). Par ailleurs, quand on observe certains coeurs adjacents dans le faisceau, comme les coeurs jaune et rose (graphe A), il semblerait que leurs signaux soient symétriques l'un de l'autre. Cela a été observé pour certains coeurs adjacents mais cela ne se produit pas dans tous les cas.

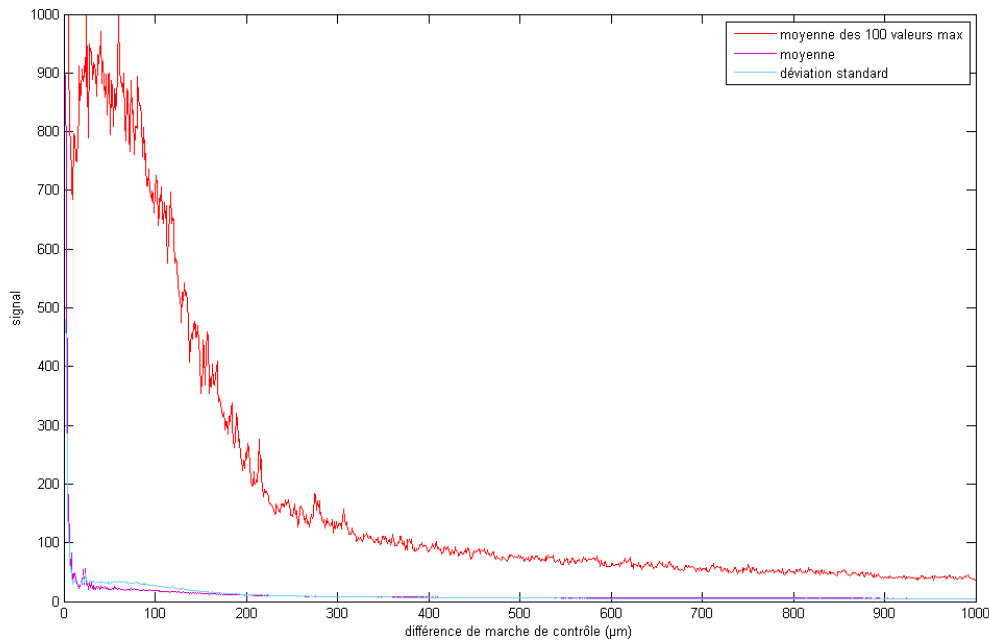


Figure 5.9 – Statistiques calculées sur une image tomographique présentant le signal parasite en l'absence d'échantillon (l'extrémité de la sonde étant dans l'air), pour une différence de marche de 0 à 1 mm par pas de 1 μm . L'image tomographique est moyennée sur 20 accumulations.

Par ailleurs, on peut s'intéresser au comportement global des fibres sur le faisceau : la figure 5.9 montre les statistiques de l'image tomographique en fonction de δ_c . On considère qu'on a accès à une valeur significative des parasites en calculant la moyenne des 100 pixels les plus grands de l'image. On voit que cette valeur décroît très rapidement avec δ_c , le signal n'étant plus visible vers $\delta_c = 300 \mu\text{m}$. Notons que l'on travaille ici à un nombre d'accumulations fixé : comme nous l'avons vu en 2.3.2 page 23, on peut moyenner plusieurs images tomographiques du même objet de manière à augmenter le rapport signal-sur-bruit. Puisque le signal parasite ne se comporte pas comme un bruit, plus on accumule d'images plus il devient visible à des différences de marche élevées.

En outre, on peut distinguer à l'intérieur d'un même coeur multimode plusieurs signaux parasites, comme illustré sur la figure 5.10.

En effet nous travaillons avec des fibres ayant plusieurs modes de propagation possibles. L'état multimodal ou monomodal d'une fibre optique est caractérisée par une grandeur V appelée fréquence normalisée, définie par :

$$V = \frac{2\pi a}{\lambda} \sqrt{n_{\text{coeur}} - n_{\text{gaine}}} \quad (5.1)$$

avec a le rayon du coeur. Notons que pour une fibre optique à saut d'indice, $\sqrt{n_{\text{coeur}} - n_{\text{gaine}}}$ représente son ouverture numérique NA.

La fibre est monomode si $V \leq 2.405$, sinon plusieurs modes de propagation coexistent [112]. On peut approximer le nombre de modes par $V^2/2$. Dans notre cas, $a \simeq 1 \mu\text{m}$ et NA $\simeq 0.35$, ce qui donne $V \simeq 2.75$ pour $\lambda = 0.8 \mu\text{m}$. Il y a environ 4 modes de propagation dans

chaque coeur, y compris le mode fondamental. Pour avoir une propagation monomode avec ce faisceau de fibres, il faudrait se placer à des longueurs d'onde supérieures à $1\text{ }\mu\text{m}$.

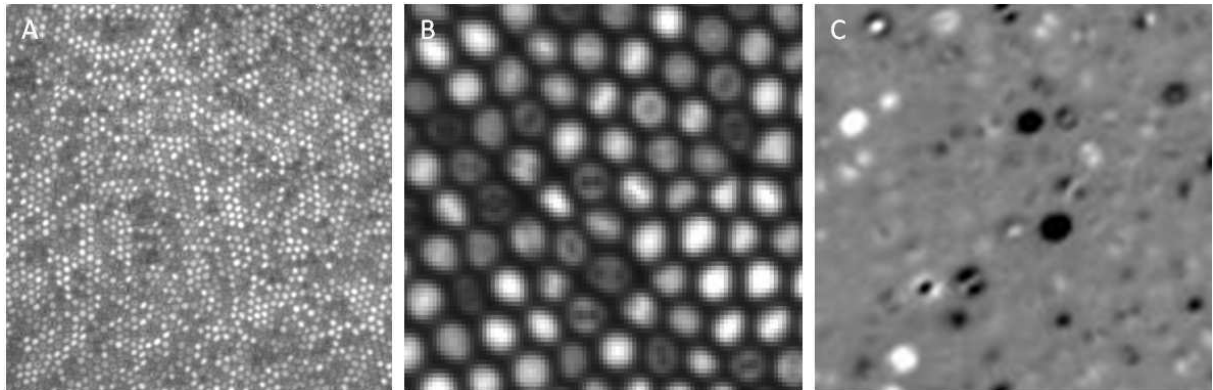


Figure 5.10 – Image directe en l'absence d'échantillon (A), détail des coeurs de fibres présentant différents modes sur l'image directe (B), détail du signal parasite sur des coeurs monomodes et multimodes (C).

5.3.2 Interprétation de l'origine du signal par les phénomènes d'auto-interférences

Le signal parasite est bien un signal interférométrique, il est révélé sur l'image tomographique par la modulation de phase du spectre cannelé de contrôle. Il est d'autre part intrinsèque au faisceau de fibres. Tout se passe comme si il y avait un interféromètre supplémentaire en plus de l'interféromètre imageur, on pourrait parler 'd'interféromètre de faisceau'.

Il y a donc création à l'intérieur du faisceau d'une distribution de différents chemins optiques, dont les interférences sont révélées par notre montage. Nous pensons que ces différences de marche sont créées par deux phénomènes : le couplage inter-fibres entre coeurs adjacents, et le couplage intra-fibre entre modes de propagation.

Couplage inter-fibres entre coeurs adjacents

Dans un faisceau de fibres tel que celui utilisé (IGN 08/30, Sumitomo), les coeurs sont proches (environ $1\text{ }\mu\text{m}$ de rayon séparés de $d=3.5\text{ }\mu\text{m}$) et baignent dans une gaine commune. Il peut alors y avoir couplage, c'est-à-dire passage de la lumière d'un coeur à l'autre, par l'intermédiaire des ondes évanescentes associées aux modes propagatifs. C'est un phénomène connu appelé diaphonie ou 'cross-talk'.

Les équations de couplage peuvent être résolues analytiquement dans certains cas (peu de fibres, fibres identiques, de forme parfaitement cylindrique tout au long de la fibre, monomodes) ou de manière numérique (par méthode des différences finies notamment) [112].

L'efficacité du couplage est caractérisé par un coefficient C , en μm^{-1} . D'un point de vue simplifié, on peut considérer que $1/C$ représente la longueur caractéristique au bout de laquelle tout le signal d'une fibre est passé dans l'autre. Le couplage est plus important

pour des coeurs de petit rayon, des longueurs d'ondes élevées, des contrastes entre indices de coeur et de gaine plus élevés, et bien sûr des distances plus petites. Par exemple, pour deux coeurs de fibres 'SMF28' de rayon $a \sim 4 \mu\text{m}$ le coefficient de couplage C pour $\lambda = 1.5 \mu\text{m}$ varie de $10^{-4} \mu\text{m}^{-1}$ pour une distance interfibre $d = 2a$, à $10^{-6} \mu\text{m}^{-1}$ pour $d = 4a$ (cas de nos fibres) [112], ce qui veut dire que la longueur de couplage caractéristique est de l'ordre de 1 m.

Il a cependant été montré numériquement que le couplage est réduit dans les faisceaux de fibres comparé au cas 'parfait' grâce à la non-uniformité des coeurs, de tailles et de formes toutes différentes qui varient le long de la fibre. Pour des fibres très semblables aux nôtres (FIGH 10-350S, Fujikura), avec $a = 1 \mu\text{m}$, $d = 3.2 \mu\text{m}$, $\lambda = 0.6 \mu\text{m}$, un modèle numérique avec 7 coeurs donne une longueur de couplage de 1 cm, et le couplage ne se fait qu'à hauteur de 10 % du signal total d'un coeur [113].

Dans notre faisceau, de longueur typique 1 m, tout ou partie du signal passe ainsi d'un coeur adjacent à un autre, et peut éventuellement revenir au coeur de départ. Sur 30 000 fibres, on imagine aisément que cela crée un nombre important de chemins différents. Cependant nous utilisons une source de faible cohérence spatiale, ce qui réduit la diaphonie. La lumière injectée dans un coeur ne peut pas interférer avec celle venant d'un coeur voisin, car elles ne sont pas cohérentes entre elles. Donc parmi tous les chemins qui se créent dans le faisceau, il n'y a d'interférences qu'entre des signaux venant au départ du même coeur et recombinaison ensuite. La figure 5.11 illustre cette idée.

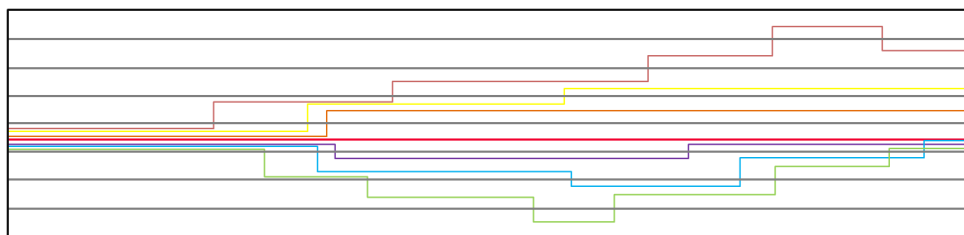


Figure 5.11 – Schéma simplifié en 2D illustrant des trajets possibles du signal d'une fibre au passage à travers le faisceau.

Notons que cela explique les comportements observés du parasite, y compris la décroissance avec δ_c (figure 5.9). En effet, se placer à un grand δ_c revient à examiner les interférences d'ondes ayant effectué un nombre important de sauts de fibres. A cause de la cohérence spatiale il faut que ces ondes soient revenues dans leur coeur de départ à la sortie du faisceau (ou que deux ondes du même coeur ressortent dans un même troisième). Cela est d'autant moins probable que le nombre de sauts est grand. Pour le comprendre intuitivement, on peut par exemple considérer une projection des chemins dans une section du faisceau et penser à une sorte de marche aléatoire en 2D¹ : plus le nombre de pas est élevé, plus l'éloignement à l'origine augmente (en racine carrée). De plus, le couplage entre coeurs ne se fait pas à 100% du signal, plutôt à 10%, donc les ondes effectuant plus de sauts perdent en intensité. Cela explique bien qu'à grandes différences de marche, moins de coeurs sont allumés et de manière moins intense.

1. Bien sûr il ne s'agit pas physiquement d'un phénomène aléatoire, car nous avons déjà vu qu'ici le signal parasite présente un schéma déterministe et que le phénomène de saut de fibres n'est pas aléatoire. Il est notamment déterminé par les imperfections du faisceau, qui sont établies à sa fabrication.

La diaphonie est intrinsèque à l'utilisation de notre faisceau de fibres et ne peut être supprimée. Le couplage serait moins fort pour des coeurs plus gros et plus espacés, mais le faisceau de fibres aurait alors soit un diamètre bien plus large soit bien moins de pixels, et perdrait les qualités requises pour un endoscope. Il existe pourtant des faisceaux de fibres d'un type différent, dit 'leached' ou filés, dans lesquels les gaines des coeurs sont fusionnées à chaque extrémité mais pas le long du faisceau. Les fibres conservent leur propres gaines, elles peuvent entrer en contact mais ne sont pas soudées. Un tel dispositif devrait réduire le couplage entre les coeurs. Les faisceaux disponibles ont cependant moins de pixels et sont moins maniables pour l'endoscopie car totalement mous.

Nous avons donc effectué l'expérience avec un tel faisceau de fibres, comprenant 18 000 coeurs de rayon $4\text{ }\mu\text{m}$ (SAP 1136247, Schott). Nous avons alors constaté que si la diaphonie était effectivement réduite, le couplage entre les coeurs n'est en réalité pas le seul phénomène à produire ces auto-interférences de faisceau : les modes de propagation dans les fibres entrent aussi en jeu.

Couplage intra-fibre entre modes de propagation

La figure 5.12 montre les images obtenues avec le faisceau Schott. Il y a toujours un signal parasite, quoique plus faible. Surtout, on y voit clairement les figures spatiales des modes, qui jouent donc aussi un rôle dans la formation d'un signal parasite. En effet, dans chaque coeur il y a une dispersion intermodale : chaque mode est caractérisé par une constante de propagation (souvent appelée β) et se propage à une vitesse différente [114]. Or ces modes peuvent également se coupler entre eux à l'intérieur d'un coeur, par exemple par les rugosités de surface, c'est-à-dire qu'il y a transfert du signal d'un mode à l'autre, de la même manière qu'il y a couplage entre plusieurs coeurs. Cela induit donc également une distribution de différences de marche et participe à la formation de l'interféromètre de faisceau.

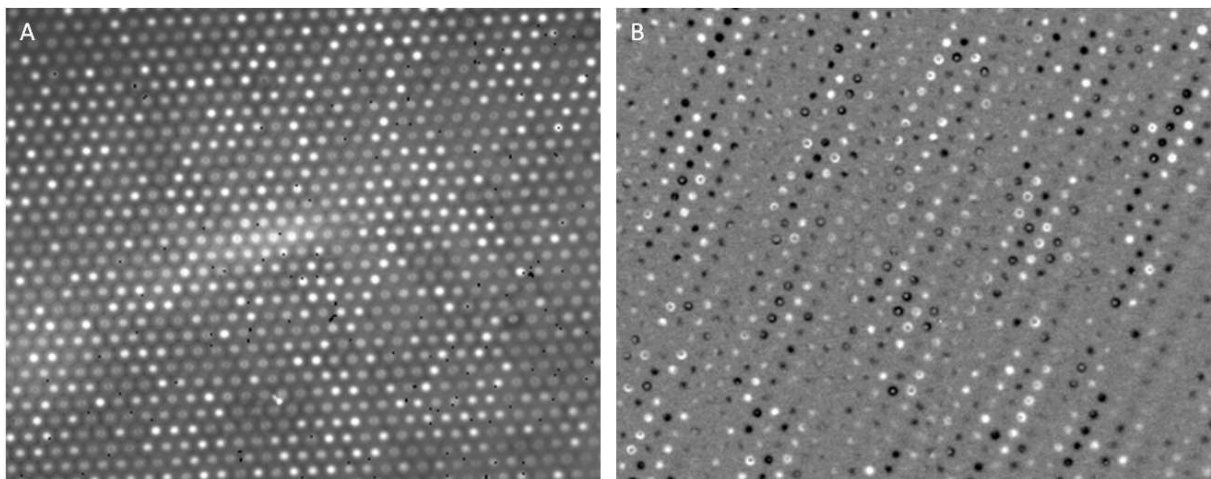


Figure 5.12 – Image directe (A) et du signal parasite (B) avec un faisceau de fibres filées (Schott).

Nous avons déjà discuté du caractère multimodal du faisceau Sumitomo, et vu qu'il devenait monomode pour $\lambda \geq 1\text{ }\mu\text{m}$. Pour vérifier notre idée, nous avons alors ajouté un filtre passe-haut à $1.1\text{ }\mu\text{m}$ et intégré une caméra infrarouge InGaAs (Xeva-1.7-640c,

Xenics) dans le montage pour travailler avec un faisceau monomode. Les images obtenues sont présentées sur la figure 5.13. On constate effectivement la disparition des modes sur l'image directe et sur le signal parasite. On peut aussi remarquer que certaines fibres sont allumées par paires, ce qui correspondrait à des paires de fibres couplées comme on a pu en deviner sur la figure 5.8.

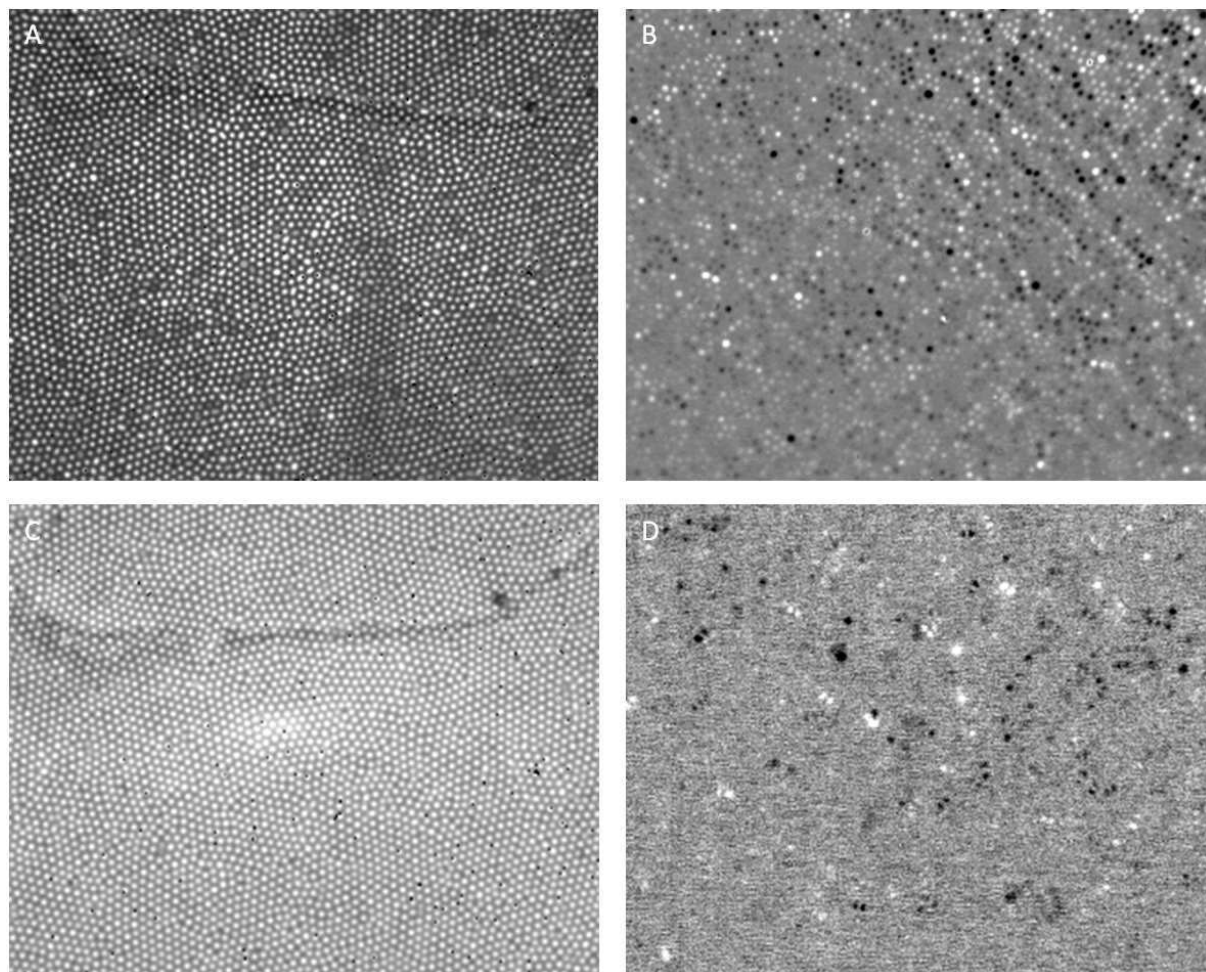


Figure 5.13 – Images directes enregistrées sans filtre (A) et avec un filtre passe-haut à 1100 nm (C), et images tomographiques du signal parasite correspondantes (B)(D).

5.3.3 Solutions proposées

Nous avons imaginé et testé différentes approches pour s'affranchir de ce signal.

Méthodes physiques

Une première approche consiste à moduler le signal parasite séparément du signal objet, pour ensuite le supprimer en effectuant des différences d'images, de la même manière que l'on réduit le fond incohérent en effectuant la modulation de phase. Cette modulation peut se faire en appliquant une légère torsion ou pression périodique sur le faisceau de manière à obtenir deux images des parasites en opposition de phase.

Cependant cette méthode s'est avérée très peu efficace, car la modulation n'impacte pas toutes les fibres de la même manière. De plus, elle n'est pas simple à mettre en oeuvre en pratique, et complique le montage pour les applications *in vivo*.

Méthodes numériques

Une autre approche passe par effectuer un traitement des images post-acquisition pour enlever la figure parasite. En effet, nous avons vu que ce signal est caractéristique du faisceau de fibres et stable dans le temps. Nous pouvons donc obtenir une 'bibliothèque' de référence des parasites pour un état du faisceau donné, en enregistrant en l'absence d'échantillon une pile d'images à chaque différence de marche δ_c . Ensuite, on pourra réaliser une image d'un objet sans parasites à un δ_c donné en enregistrant l'image tomographique avec les parasites, puis en lui soustrayant l'image de référence des parasites.

En pratique on a déjà montré qu'on pouvait balayer la différence de marche δ_c par pas fins (figure 5.7), de manière à obtenir une bibliothèque correctement échantillonnée en δ_c .

Pour que la soustraction soit efficace, il faut ensuite pouvoir se placer exactement au même δ_c pour imager. Or il s'est avéré expérimentalement que l'actionneur utilisé pour contrôler ce trajet (T-NA08A25, Zaber), s'il peut se déplacer très finement par pas de 20 nm, n'en a pas moins une mauvaise fidélité. On n'est ainsi pas capable, par commande numérique du moteur, de retrouver exactement la différence de marche voulue avec une précision meilleure que 1 μm , ce qui est plus élevé que la période des parasites (700 nm) et donc rédhibitoire.

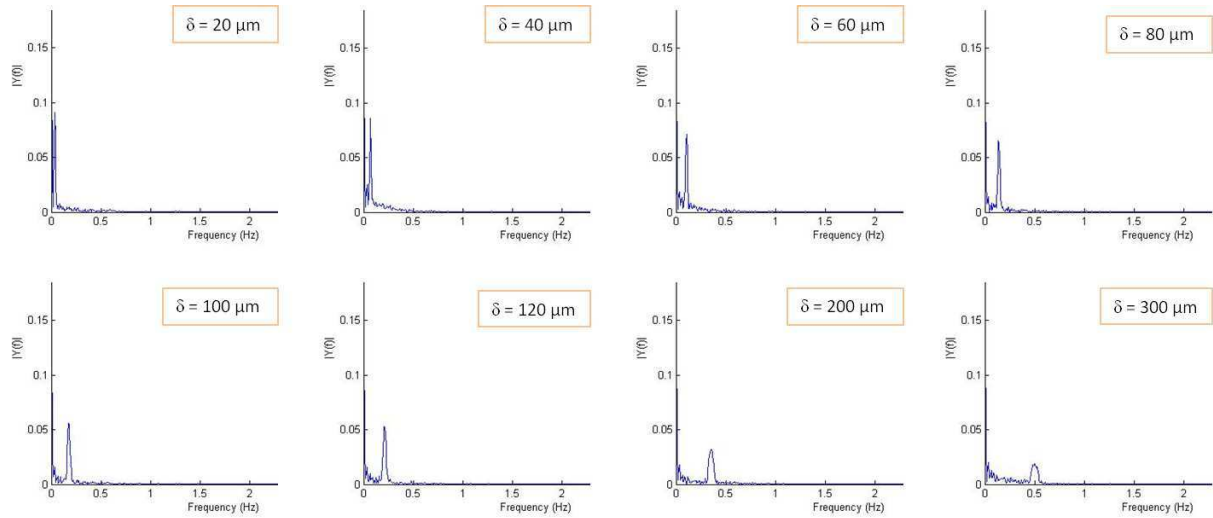


Figure 5.14 – Graphes obtenus par traitement du spectre cannelé de contrôle pour différentes différences de marche, montrant un pic à la fréquence des franges de cannelures.

Nous avons pensé à obtenir la valeur de δ_c en la déduisant de la fréquence des franges du spectre cannelé enregistré par le spectromètre. Si nous étions capables d'obtenir cette valeur assez précisément en temps réel, nous pourrions effectuer le recalage voulu. Le spectromètre utilisé a une résolution inférieure à 1 nm (CCS175, Thorlabs). Nous avons vu que le spectre cannelé est le spectre de la source modulé sinusoidalement en nombre d'onde par des franges de pas $1/\delta$. On peut retrouver la fréquence des franges dans la

transformée de Fourier du spectre, comme illustré sur la figure 5.14. Quand δ augmente, la fréquence des franges augmente et celles-ci sont donc moins bien échantillonnées, ce qui explique que le pic correspondant dans la transformée de Fourier s'élargisse et devienne plus faible. Malheureusement, cette technique n'a pas permis une reconnaissance assez précise de δ_c . Les pics sont en effet trop larges, ce qui est dû au bruit du spectre (pics de la source, instabilité dans le temps) et à la résolution de la transformée de Fourier utilisée (relié à l'échantillonnage dans le domaine temporel, soit à la largeur du spectre).

Outre le problème de recalage en δ , cette méthode est également sensible au fait que lors de l'utilisation du faisceau le signal parasite risque d'être modifié par les pressions ou autres mouvements, ce qui n'est pas pris en compte dans la bibliothèque constituée avant d'imager. La correction d'images ne pourrait donc pas être vraiment efficace.

Solution optique

Nous avons pu observer sur la figure 5.9 que le signal parasite décroît avec δ_c . Si on pouvait travailler avec de grands δ_c on n'aurait ainsi pas de signal parasite.

Par exemple, déjà à $\delta_c = 50 \mu\text{m}$ les parasites sont moins gênants. Pour imager à de plus grandes profondeurs, on peut rajouter à l'extrémité du faisceau une lentille GRIN pour focaliser en avant, comme illustré sur la figure 5.15. Cette lentille peut être simplement accolée au faisceau via une huile d'indice, ou collée avec une colle optique.

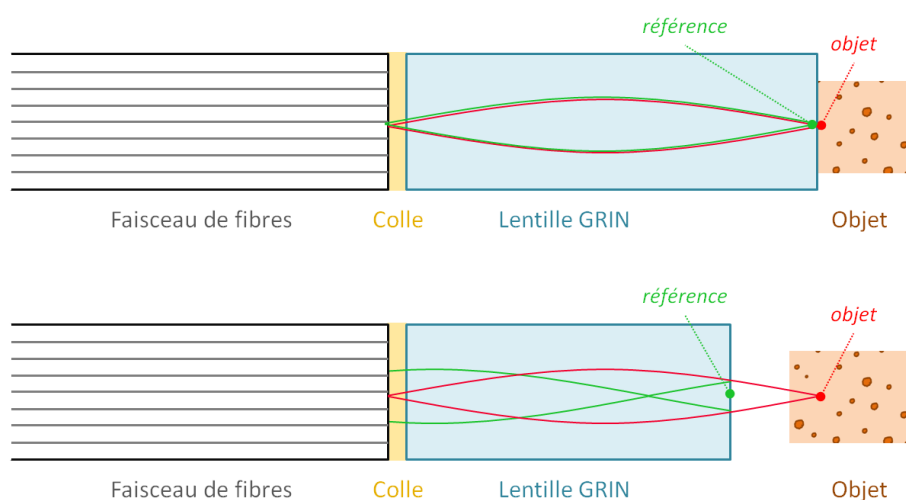


Figure 5.15 – Schéma du faisceau de fibres avec une lentille GRIN qui focalise sur sa face de sortie (haut) et en avant (bas).

En réalisant cela avec des lentilles GRIN de diamètre 1 mm et d'ouverture 0.2 focalisant à 0 et 50 μm en avant, nous nous sommes aperçus que la structure des modes à l'intérieur des coeurs n'était plus visible sur l'image directe (figure 5.16), mais également que le signal parasite diminuait d'un facteur 5, à δ_c égal.

En effet, dans le cas d'une lentille GRIN bien focalisée, on a un retour monomode des signaux objet et référence dans le faisceau car seul le mode fondamental est excité avec cette ouverture numérique plus faible. Il existe en effet un angle de transition qui marque la frontière entre les régimes monomode et multimode [115] [116]. Dans le cas d'une lentille

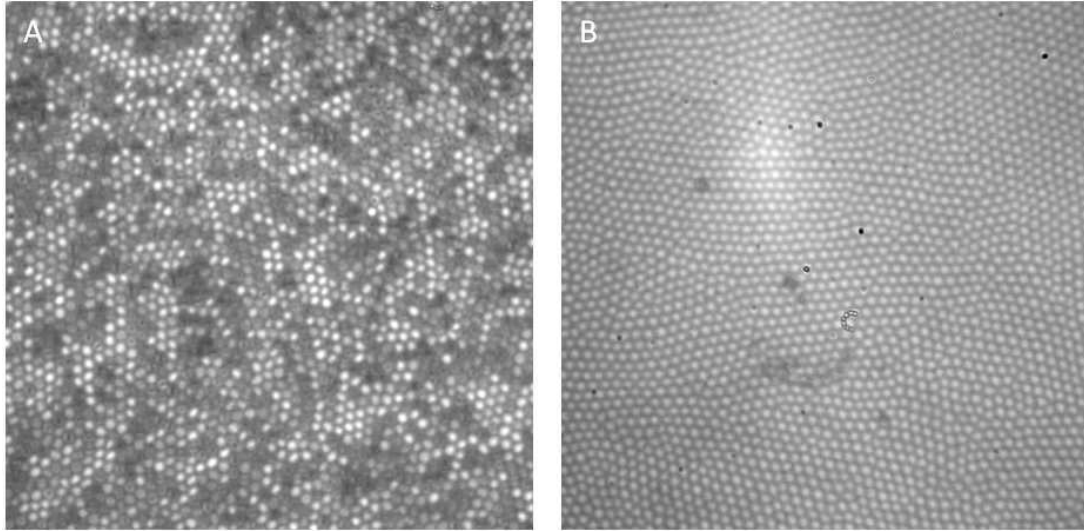


Figure 5.16 – Image directe sur le faisceau seul (A), et sur le faisceau suivi d'une lentille GRIN (B).

GRIN focalisant en avant, le signal référence réfléchi sur la face de sortie de la lentille est défocalisé. En réinjection cela sélectionne les modes ayant la plus grande profondeur de champ, donc le mode fondamental. Cela explique le filtrage des modes et la diminution du signal parasite observé.

Cependant, telle quelle cette configuration pose un problème : le signal de référence a un défaut de focalisation. La lumière sortant d'un coeur et réfléchi sur la référence arrive au retour sur le faisceau en illuminant une large zone autour du coeur, ce qui est illustré figure 5.17.

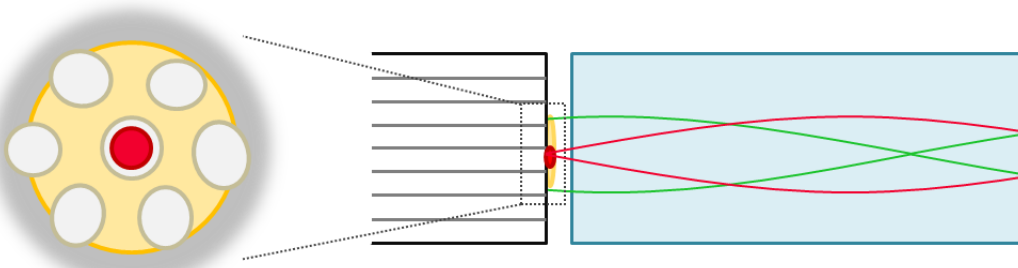


Figure 5.17 – Schema de l'effet de la défocalisation de la référence lors de la réinjection dans le faisceau.

Le rayon D de cette zone dépend de l'ouverture numérique, ici 0.2, et de la profondeur de défocalisation, ainsi à 50 μm dans l'air, on a $D = 50 \times 0.2 = 10 \mu\text{m}$. La distance inter-fibres étant de $d = 3.5 \mu\text{m}$, on illumine bien plusieurs couches de coeurs autour du centre. Cela pose deux problèmes.

D'une part, le signal de référence, qui est celui effectivement réinjecté dans le coeur, est réduit d'un facteur $(D/a)^2$ soit 100. Quantitativement, on a alors une référence effective de coefficient R_{eff} de $5 \cdot 10^{-4}$ dans l'air est de $5 \cdot 10^{-5}$ dans l'eau. Cela diminue l'importance du signal référence par rapport aux bruits du montage (réflexions sur les composants

optiques...), et diminue l'efficacité de l'amplification du signal objet par la détection interférométrique (expliquée au chapitre 2).

D'autre part, les fibres situées autour reçoivent chacune une partie de ce signal, ce qui rajoute donc un bruit de fond incohérent à leur propre signal interférométrique. Cela signifie que dans chaque coeur la proportion de fond incohérent venant de tous les coeurs proches par rapport au signal de référence est $C \frac{R-R_{\text{eff}}}{R_{\text{eff}}}$, soit $C ((D/a)^2 - 1)$, où C est la compacité du faisceau (la surface occupée par les coeurs comparée à la surface totale). Ici pour 30 000 fibres dans un diamètre total de 800 μm on peut estimer que $C = \frac{30000 * \pi a^2}{\pi 400^2} \simeq 0.2$. Quantitativement, on trouve donc que la lumière incohérente réinjectée est deux fois plus élevée que le signal de référence, ce qui est bien trop important.

On peut donc en conclure qu'il est important de garder un signal de référence correctement focalisé. Pour imager à de grandes différences de marche de contrôle mais à des profondeurs raisonnables dans l'objet, il faut donc trouver une autre solution.

Nous proposons d'utiliser toujours une lentille GRIN, mais en plaçant la surface de référence au niveau de la face d'entrée. On introduit ainsi une très grande différence de marche, la lentille elle-même, que l'on va directement compenser en introduisant une lentille semblable dans l'interféromètre de contrôle. Ce nouveau dispositif est détaillé au chapitre 6.

CHAPITRE 6

Système à endoscope flexible pour l'OCT Plein Champ

Table des matières

6.1	Détails du montage et choix des interféromètres	76
6.1.1	Interféromètre contrôleur	76
6.1.2	Montage complet	78
6.2	Dépixélisation de l'image	80
6.2.1	Méthode par filtrage dans l'espace de Fourier	80
6.2.2	Méthode par convolution	80
6.2.3	Méthode par cartographie des coeurs et interpolation	82
6.3	Résultats d'imagerie	85
6.4	Discussion	85
6.4.1	Améliorations à apporter au montage	85
6.4.2	Conclusion	87

Nous avons présenté dans les chapitres 4 et 5 les principes généraux de nos montages d'OCT Plein Champ fibrée à deux interféromètres, et l'apparition des phénomènes optiques d'auto-interférences du faisceau dont il faut s'affranchir. Nous avons finalement évoqué la solution d'imager en utilisant une grande différence de marche de contrôle, typiquement supérieure au millimètre, et donc une grande différence de marche d'imagerie, tout en gardant une profondeur d'imagerie pertinente, c'est-à-dire entre 0 et 200 μm . Nous proposons pour cela de modifier les interféromètres contrôleur et imageur, en incluant notamment des lentilles GRIN.

Nous décrivons ici en détails un nouveau montage en endoscopie flexible et les performances attendues. Nous allons également proposer des méthodes de traitement d'images en temps réel pour retirer l'artefact de pixélisation dû aux fibres du faisceau. Enfin nous présenterons des résultats d'imagerie, et discuterons des perspectives à donner à notre système.

6.1 Détails du montage et choix des interféromètres

6.1.1 Interféromètre contrôleur

Tout d'abord, nous allons voir que l'interféromètre de Michelson utilisé précédemment pour créer le spectre cannelé de contrôle ne peut pas être employé pour de trop grandes différences de marche. On injecte en effet dans l'interféromètre des rayons avec des angles d'incidence entre 0 (normale) et α , comme on peut le voir sur la figure 6.1. α dépend du montage : dans notre précédent système nous injectons via une fibre optique de rayon $r=0.5$ mm et un objectif de microscope de focale $F=10$ mm, ce qui donne $\alpha \simeq \tan\alpha \simeq 0.05$ rad. Dans l'air, la différence de marche créée par les rayons en incidence normale sur les miroirs est $\delta_0 = 2e$ et pour les rayons à l'angle d'incidence α $\delta_\alpha = 2e \cos\alpha$. L'écart entre la plus petite et la plus grande différence de marche dans l'interféromètre est $\Delta\delta = 2e(1 - \cos\alpha) \simeq 2e\alpha^2/2$, en approximant pour des petits angles. Pour que toutes les figures d'interférences résultantes ne se brouillent pas, il faut que cet écart ne soit pas trop important, on choisit le critère $\Delta\delta \leq \frac{\lambda}{4}$, soit dans notre cas $e \leq 160$ μm . Cela veut dire qu'au-delà de $\delta_c \sim 300$ μm le spectre cannelé de contrôle est de mauvaise qualité et les images se dégradent.

Au contraire, il est possible de garder une bonne modulation à de grandes différences de marche avec un interféromètre de Linnik (décrit en annexe A). En effet, dans un tel interféromètre les objectifs de microscope focalisent la lumière sur les miroirs objet et référence, tandis que le faisceau est bien collimaté en amont de ces objectifs, là où l'on crée la différence de marche.

Cependant si l'on utilise simplement un Linnik, le grand δ_c créé est dans l'air, il doit

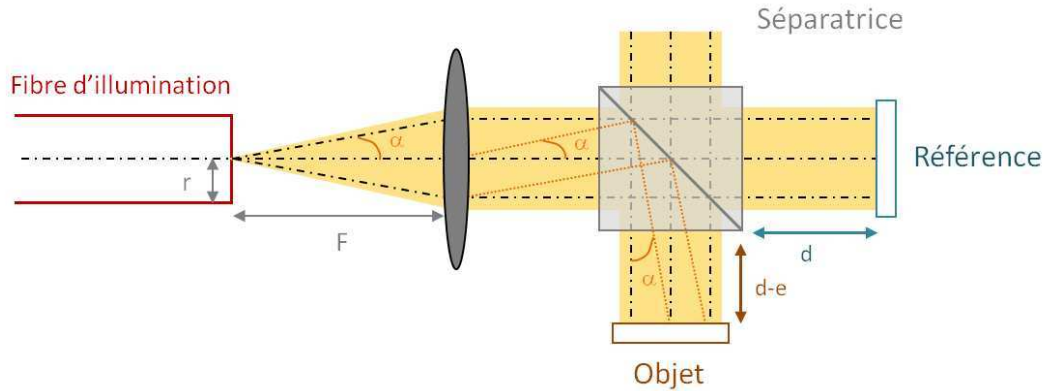


Figure 6.1 – Schéma d'un interféromètre de Michelson éclairé à des angles d'incidence entre 0 et α .

donc être compensé de même dans l'interféromètre imageur. Cela supposerait de laisser un espace d'air entre le bout de la sonde et le tissu, ce qui n'est pas évident pour l'*in vivo*. Il faudrait plutôt, pour garder une distance définie, introduire une fenêtre en verre entre la sonde et le tissu, qui serait à son tour compensée dans l'interféromètre contrôleur.

Nous avons alors pensé à utiliser pour cela, plutôt qu'une lame de verre, une lentille GRIN de pitch 0.5 (voir annexe A), comme illustré sur la figure 6.2. Cette lentille est bien adaptée à l'extrémité de la sonde, sa face d'entrée constitue la référence de l'interféromètre imageur. Dans l'interféromètre contrôleur, on place la lentille GRIN dans un bras au plan focal de l'objectif. La lumière est refocalisée en sortie sur le miroir. La différence de marche totale est alors en partie due à la lentille D_{GRIN} , chemin exactement compensé au bout de la sonde, et pour l'autre partie au décalage e entre les deux bras du Linnik dans l'air. Cette deuxième partie, que l'on peut varier, représente la profondeur d'imagerie e_{img} dans l'objet, soit $e_{\text{img}} = e/n$ avec n l'indice de l'objet. La différence de marche totale de fonctionnement du système est $\delta_c = 2 n_{\text{GRIN}} D_{\text{GRIN}} + 2 e$.

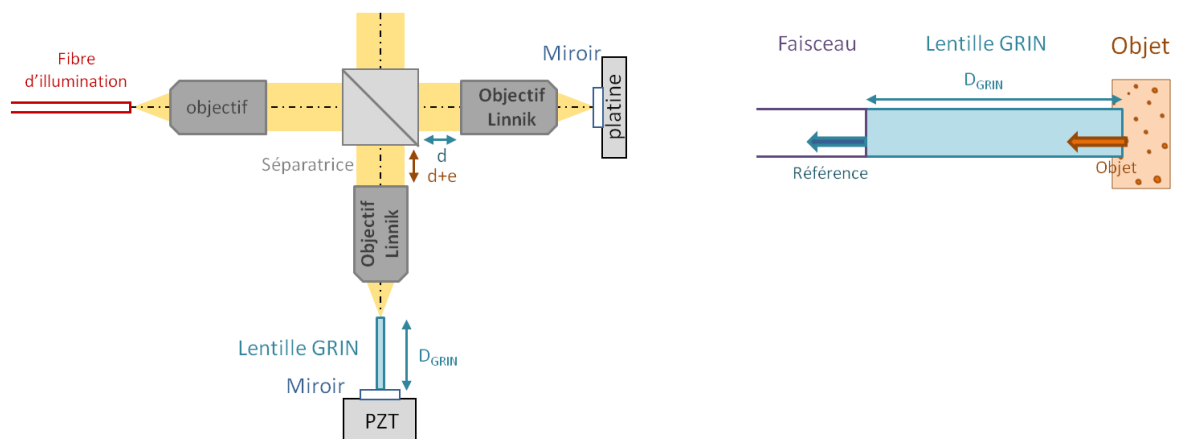


Figure 6.2 – Schéma d'un interféromètre de Linnik avec une lentille GRIN dans un bras.

Notons que dans cette configuration, la surface de référence de l'interféromètre imageur n'est plus en contact avec l'objet. Cela garantit de conserver un coefficient de réflexion bien défini et uniforme dans le champ, quel que soit l'objet imagé.

imageur, on choisit le coefficient de réflexion sur la face d'entrée de la GRIN de manière à ce que la référence soit supérieure à la lumière incohérente. Nous avons fait déposer une fine couche de diélectrique pour obtenir un coefficient de réflexion de 12 %.

Un doublet de focale 200 mm focalise l'image sur le détecteur. Il s'agit d'une caméra CMOS de 1024*1024 pixels pouvant fonctionner à 150 Hz (PHF-MV-D1024E-160-CL-12, Photonfocus).

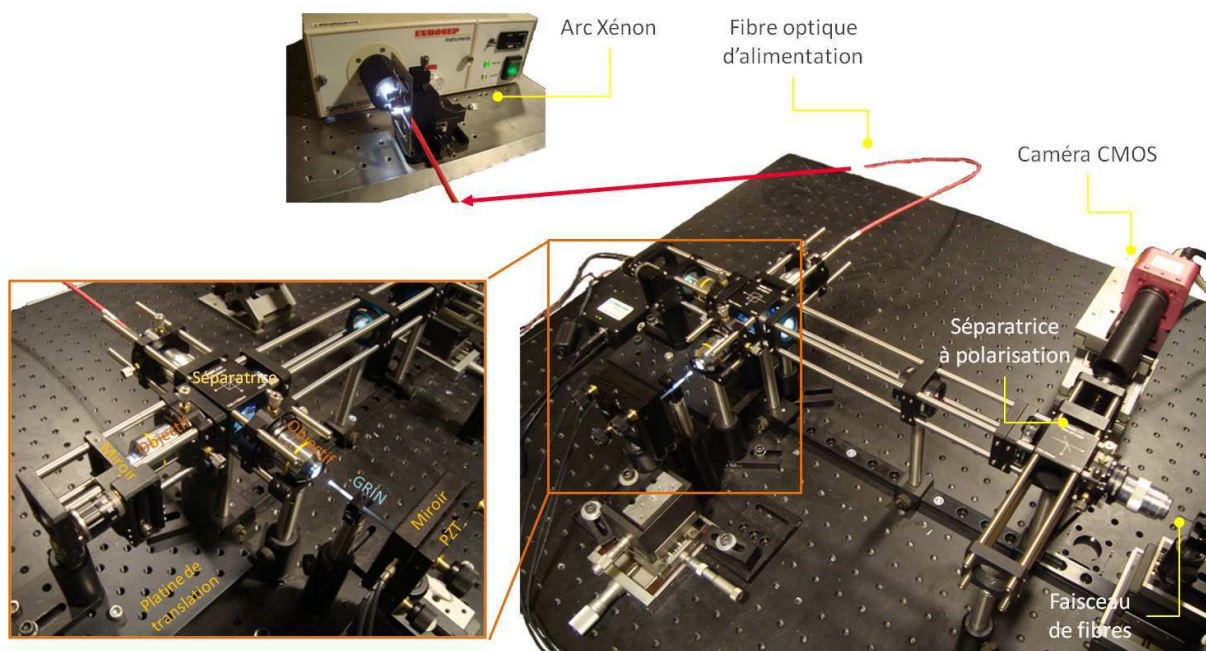


Figure 6.4 – Montage d'OCT Plein Champ en endoscopie flexible.

Un aspect important de ce montage est qu'on utilise un cube séparateur à polarisation pour injecter la lumière dans le faisceau et pour renvoyer la lumière en sortie du faisceau sur la caméra. On pourrait également utiliser une séparatrice simple et deux polariseurs croisés placés avant et après, mais cela entraînerait des pertes de lumière dans le montage. Cela nous permet en fait d'éliminer une bonne partie des réflexions parasites sur les composants du montage, notamment sur la face avant du faisceau de fibres.

Nous exploitons pour cela la propriété du faisceau de fibres de ne pas conserver les états de polarisation de la lumière [117]. La lumière transmise par la séparatrice et injectée dans le faisceau est polarisée dans un état P_1 , mais la lumière au retour du faisceau (signal de référence et signal objet) est dépolarisée. Les signaux peuvent donc être réfléchis par la séparatrice dans un état de polarisation orthogonal P_2 et atteindre le détecteur. Au contraire la lumière parasite, qui est restée dans le même état de polarisation P_1 , est bloquée en réflexion à travers la séparatrice, elle n'atteint donc pas le détecteur.

Les résolutions obtenues sont 1.8 μm axiale et 4.9 μm transversale (mesurée sur une mire), pour un champ de 0.8 mm * 0.8 mm.

La sensibilité est évaluée à -70 dB à 50 accumulations, elle est déduite du rapport signal-sur-bruit mesuré expérimentalement sur une lame de verre.

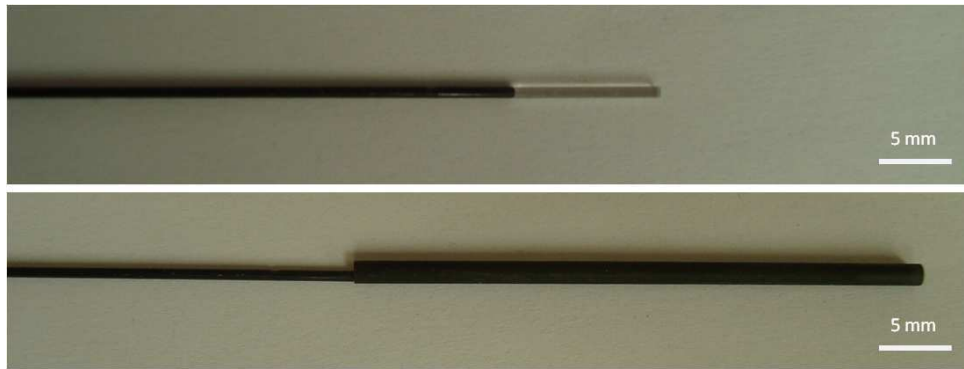


Figure 6.5 – Faisceau de fibres avec lentille GRIN de 1 mm et de 2 mm de diamètre.

6.2 Dépíxélisation de l'image

L'image transportée par le faisceau de fibres présente une píxélisation particulière qui dégrade la qualité visuelle finale. Les appareils d'endoscopie industriels réalisent donc un traitement d'image en temps réel pour enlever ces artéfacts, par exemple en endomicroscopie confocale [92].

C'est également ce que nous voulons faire dans notre système. Des méthodes très diverses peuvent être employées, nous allons ici en proposer quelques unes, en essayant d'atteindre un traitement en temps réel.

6.2.1 Méthode par filtrage dans l'espace de Fourier

Les fibres du faisceau ont des formes irrégulières, mais gardent toutefois des tailles relativement similaires, à environ 10 % près [113]. Le passage d'un coeur à un autre via la gaine possède donc une fréquence spatiale assez bien définie, que l'on peut retrouver sur la transformée de Fourier bidimensionnelle de l'image (figure 6.6). On peut alors appliquer un masque dans le domaine spectral pour ne garder que les basses fréquences correspondant aux coeurs. On retrouve par la transformée de Fourier inverse une image non píxelisée qu'il suffit de remettre à l'échelle.

Quoique rapide, cette technique n'est pas vraiment satisfaisante. Il reste quelques artéfacts sur l'image, car le filtrage dans l'espace de Fourier n'est pas parfait, il reste des fréquences qui ne correspondent pas aux coeurs. De plus, les résultats obtenus varient avec l'image choisie, ils sont corrects sur des objets bien contrastés comme une mire, mais beaucoup moins pour les objets biologiques qu'on aimerait imager. En appliquant un masque fréquentiel assez large on risque également de supprimer des fréquences propres à l'objet et donc de dégrader l'image.

6.2.2 Méthode par convolution

Une autre méthode est de convoluer l'image píxelisée avec un masque bien choisi, de manière à ce que les pixels des coeurs soient amplifiés et ceux de la gaine annulés (figures 6.7 et 6.8). On peut simplement utiliser un masque carré binaire, ou on peut aussi rendre

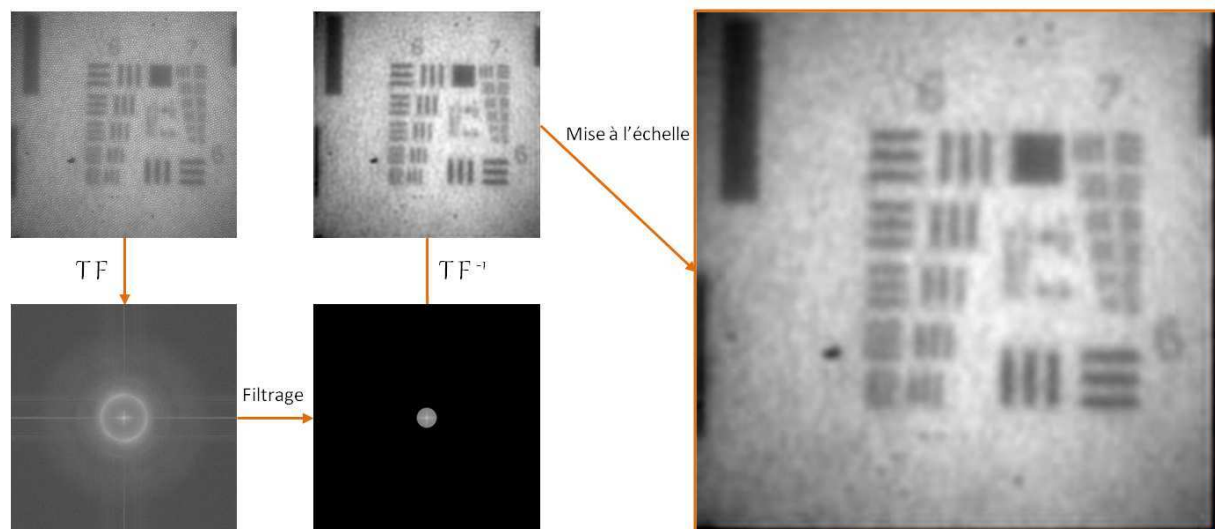


Figure 6.6 – Etapes du traitement de dépíxélisation par filtrage de la transformée de Fourier (TF).

la méthode plus efficace en introduisant un profil de décroissance gaussien à partir du centre par exemple.

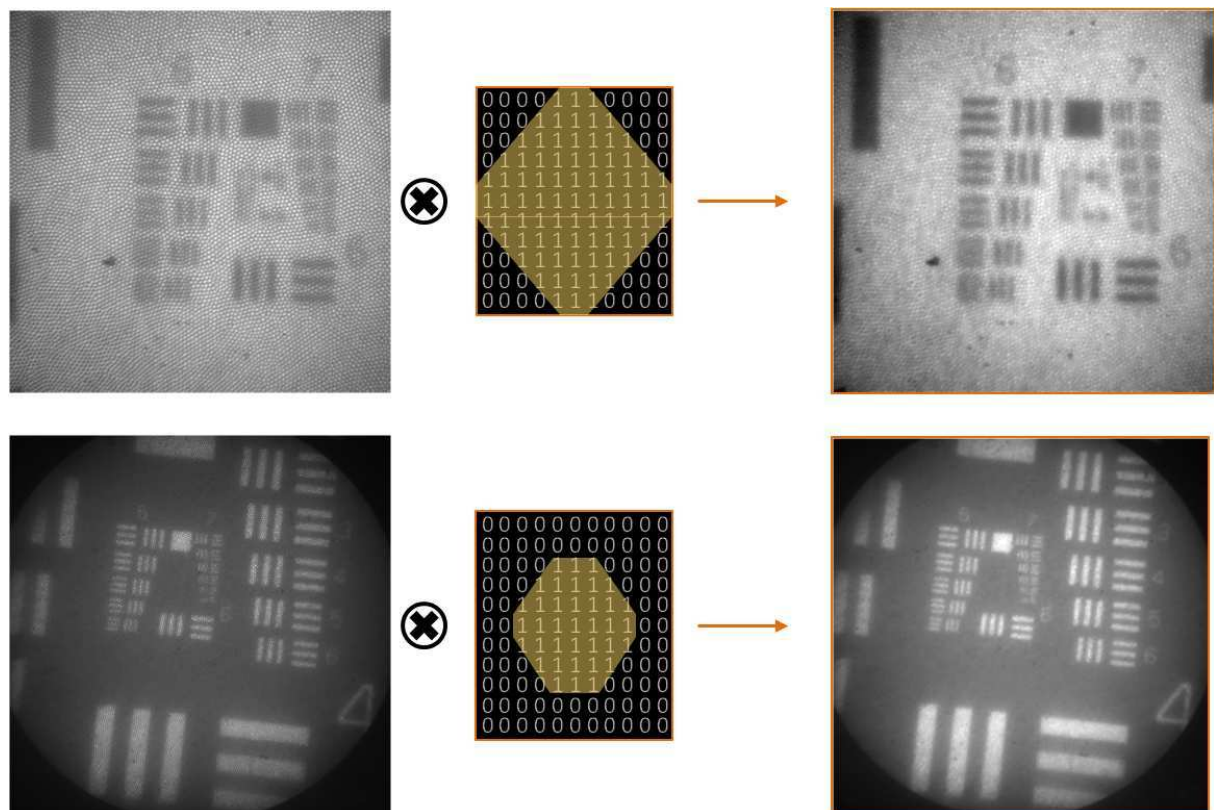


Figure 6.7 – Dépíxélisation d'images de mires, positive et négative, par convolution avec un masque hexagonal.

Les images obtenues après traitement ne sont pas parfaitement dépíxélisées mais restent acceptables. Cependant le temps de traitement est un peu trop long pour être en temps réel, de l'ordre de quelques secondes.

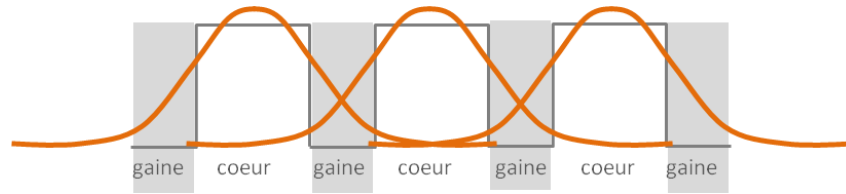


Figure 6.8 – Schéma en coupe 1D du faisceau de fibres, avec les structures des coeurs en créneaux et le masque de convolution gaussien choisi de manière à atténuer la pixélisation.

6.2.3 Méthode par cartographie des coeurs et interpolation

Un troisième type de technique, plus complexe, consiste à extraire de l'image les positions des centres des fibres (donc environ 30 000 points) auxquels on assigne la valeur moyenne sur la fibre, puis à interpoler le signal entre ces points pour reconstruire une image à 1024×1024 pixels.

Il y a donc 2 étapes distinctes qui peuvent être réalisées de différentes manières : une première étape de calibrage de la configuration du faisceau en repérant les centres de fibres, et une deuxième étape de reconstruction de l'image à partir du maillage.

Calibrage du système

Nous avons essayé deux méthodes pour obtenir les positions des centres des fibres.

Les coeurs sont bien échantillonnés sur la caméra : ils représentent en moyenne 12 pixels. Le pixel central est alors en général celui qui possède la valeur la plus élevée. En balayant l'image à la recherche des maxima locaux, on obtient rapidement les pixels correspondant aux centres des coeurs (figure 6.9).

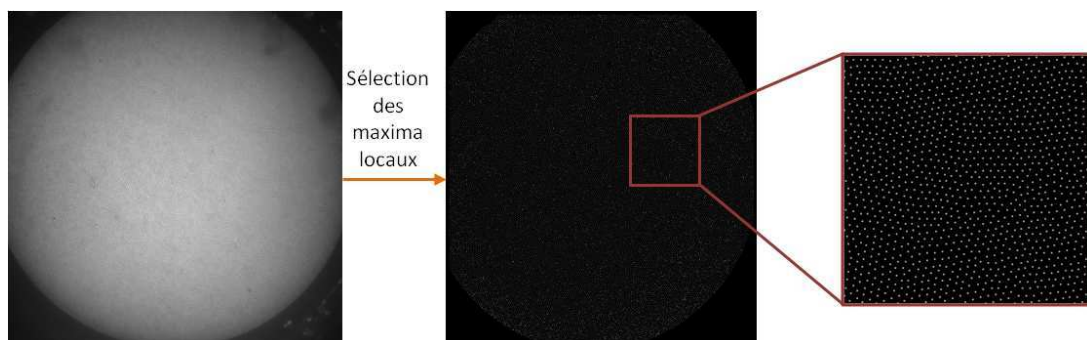


Figure 6.9 – Image pixélisée et carte des centres des coeurs obtenues en sélectionnant les maxima locaux.

Une technique un peu plus précise mais plus complexe consiste à faire une corrélation croisée entre l'image pixélisée et l'image d'un coeur unique, choisi le plus idéal possible. Les pics de la carte de corrélation résultante correspondent aux pixels centraux. Pour améliorer la finesse de ces pics, on peut effectuer un pré-traitement de l'image pixélisée. En appliquant un filtre passe-bande dans l'espace de Fourier pour ne garder cette fois-ci que la fréquence de gaine, on obtient en effet un motif des fibres plus marqué (figure 6.10).

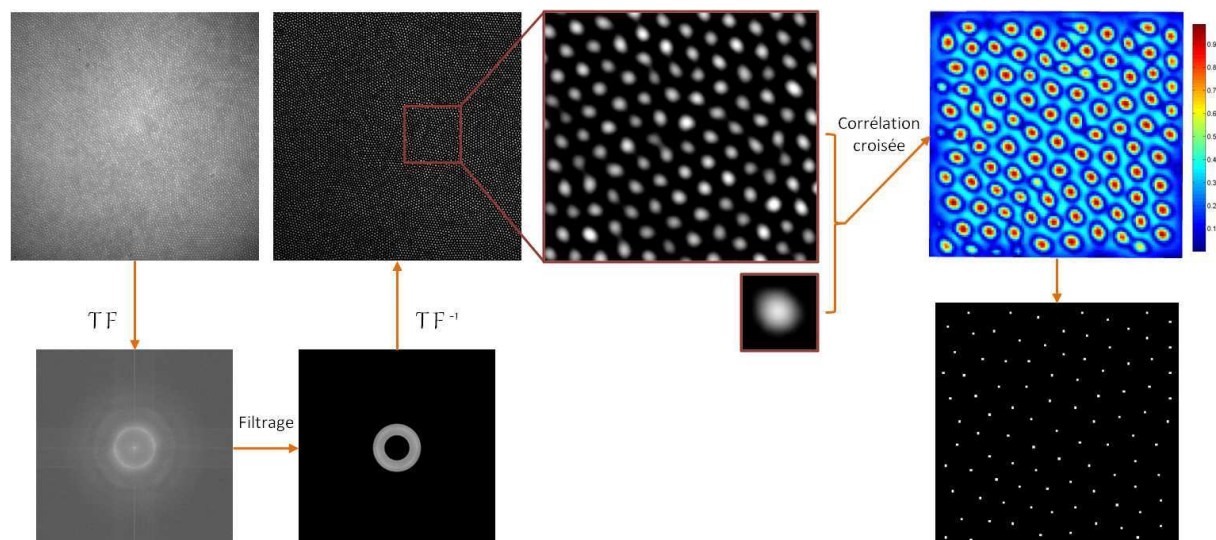


Figure 6.10 – Etapes du traitement depuis l'image pixelisée jusqu'à la carte des centres des coeurs, en utilisant une méthode avec filtrage dans le domaine de Fourier puis une corrélation croisée.

Reconstruction de l'image

La carte des coeurs obtenue est une matrice binaire de dimensions égales à l'image de départ, soit 1024×1024 , contenant 1 aux positions des centres et 0 autre part. Tout d'abord, on assigne aux pixels des coeurs la valeur du signal, soit la valeur du pixel d'origine ou mieux la moyenne sur les pixels du coeur (typiquement les 4 pixels les plus proches du centre).

On a maintenant une matrice de données formant un maillage discret mais échantillonné de manière irrégulière, car les fibres du faisceau sont elles-même arrangées de manière irrégulière. Il faut alors reconstruire une image en interpolant entre ces points. Là encore, il existe de nombreuses méthodes et nous allons discuter des plus pertinentes à notre situation.

Méthode constructive Nous avons imaginé une reconstruction qui dilate chaque pixel coeur sous la forme d'un disque au profil radial décroissant. Les disques doivent être choisis de manière à recouvrir entièrement l'image finale. En outre, en les choisissant larges, de rayon supérieur à deux distances interfibres, on peut établir une zone d'influence pour chaque coeur. Chaque pixel final aura ainsi une valeur venant non pas d'un coeur mais d'une moyenne pondérée des coeurs les plus proches, et normalisée par le nombre de coeurs influents. Cette méthode de construction d'une image par des disques recouvrants est en quelque sorte une convolution artisanale améliorée.

Les images obtenues, présentées figure 6.11, sont de bonne qualité. Cependant le temps de traitement, d'une dizaine de secondes, est trop long.

Méthode par interpolation De nombreux algorithmes existent, certains déjà disponibles dans la bibliothèque de fonctions de Matlab. Nous en avons comparé plusieurs :

Algorithme Gaussien Il utilise une fonction à décroissance gaussienne [118]

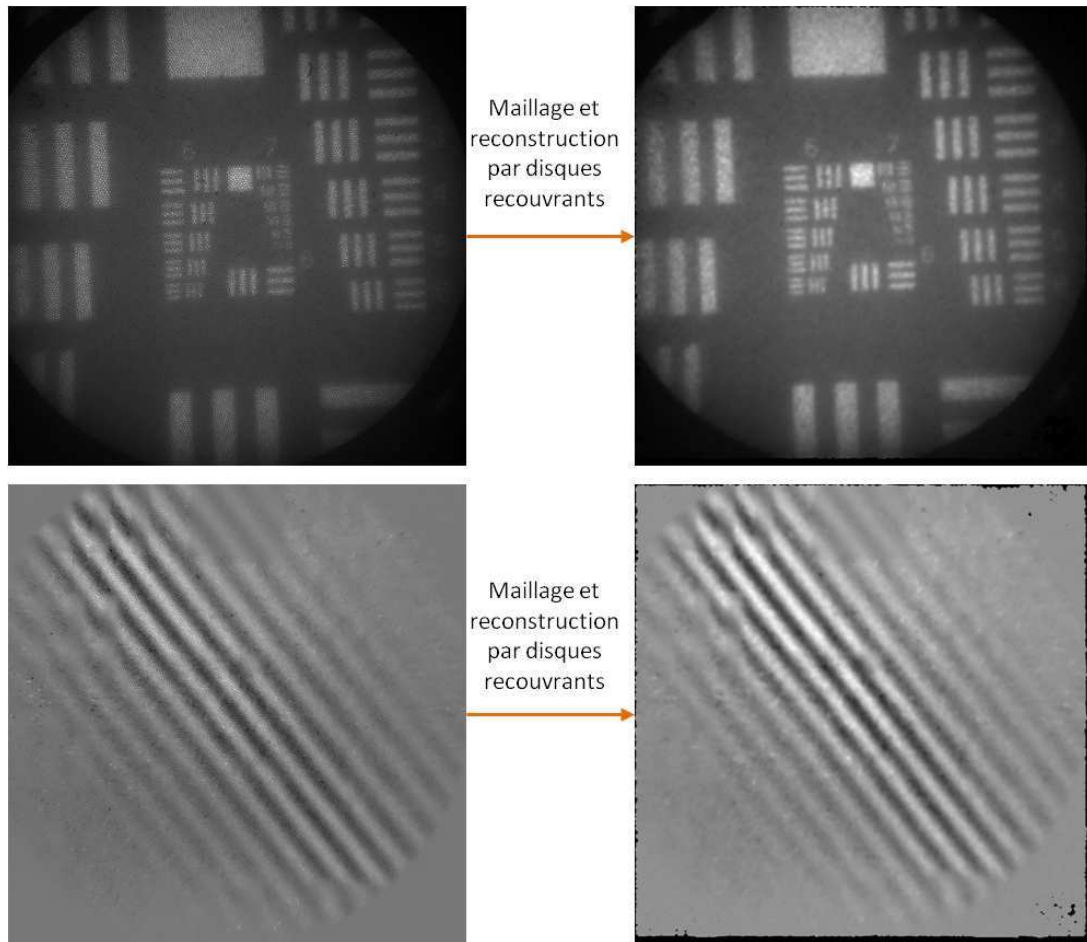


Figure 6.11 – Images pixélisées et images correspondantes obtenues par reconstruction par disques, sur une image de mire (haut) et sur une image de franges (bas).

Algorithme de Shepard Les pixels interpolés sont fonctions de l'inverse de la distance au centre de référence [119] [92].

Triangulation de Delaunay L'interpolation peut se faire avec une fonction linéaire ou cubique. Elle est implémentée par Matlab sous le nom 'Griddata'.

Interpolation par B-splines multi-niveaux On utilise des fonctions B-splines cubiques (polynômiales). Dans une amélioration dite multi-niveaux, on calcule à la fin l'erreur engendrée par l'interpolation puis on additionne les deux images afin d'obtenir une meilleure précision [120].

Au niveau de la qualité d'image, nous avons trouvé que la triangulation de Delaunay et l'algorithme par B-splines multi-niveaux fournissent les meilleurs résultats, mais ils sont malheureusement trop longs (≥ 1 s). Au contraire les algorithmes Gaussien et de Shepard sont rapides (≤ 1 s), et donnent des images tout à fait acceptables (voir figure 6.12). Nous avons finalement décidé d'utiliser l'algorithme Gaussien car les images nous ont semblé de manière subjective légèrement plus agréables à regarder qu'avec l'algorithme de Shepard.

Pour gagner en vitesse, l'algorithme de traitement d'images complet a ensuite été programmé en langage C et intégré au logiciel d'acquisition du système, dans le cadre d'un stage. Le temps de traitement par image est ≤ 0.2 s, il est effectué en même temps que l'acquisition.

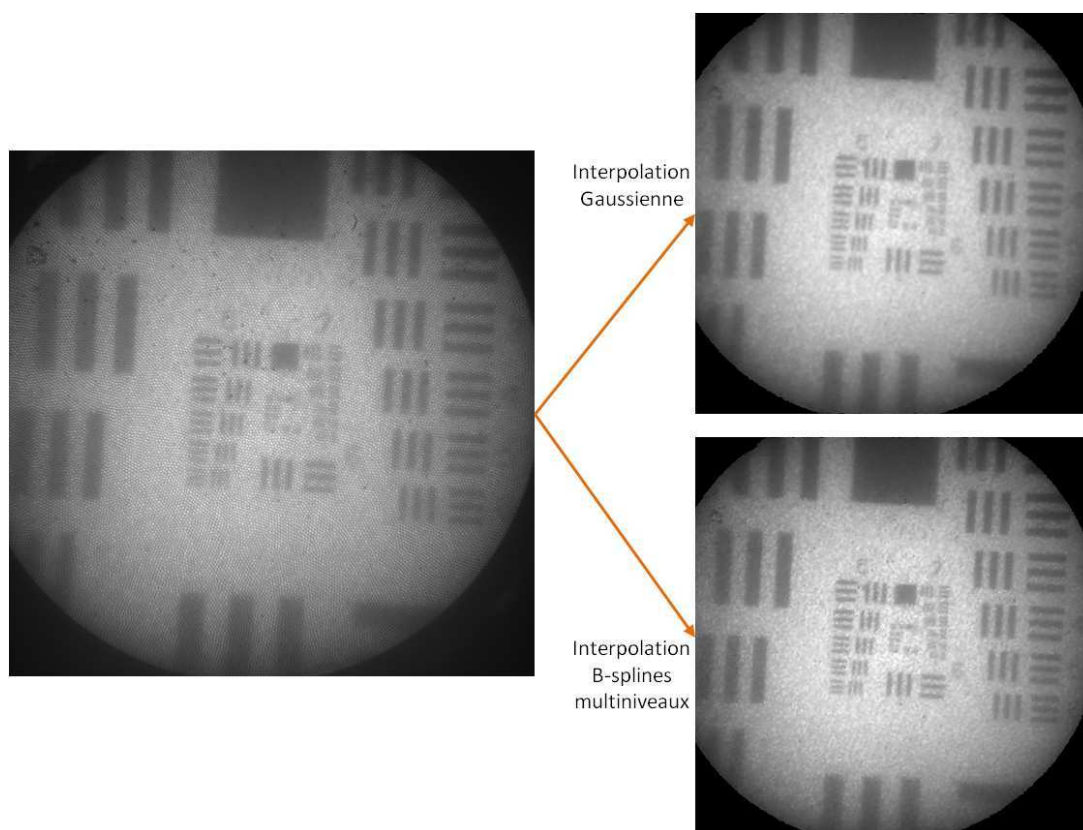


Figure 6.12 – Images pixélisées et images correspondantes obtenues par interpolation Gaussienne et par interpolation en B-splines multiniveaux.

6.3 Résultats d'imagerie

Nous avons imagé un échantillon modèle, appelé 'phantom'. Il est composé de billes de TiO_2 , de diamètre de l'ordre de $2\ \mu\text{m}$, d'indice 2.5, de coefficient d'anisotropie $g = 0.7$, dans une matrice de polyuréthane d'indice 1.5. Les images sont présentées figure 6.13. Le diamètre des billes est inférieur à la résolution, mais on peut tout de même les imaginer, à moindre contraste.

6.4 Discussion

6.4.1 Améliorations à apporter au montage

Il y a principalement deux points qui peuvent être améliorés sur le montage.

Sensibilité

En l'état, la sensibilité est un peu trop faible pour apporter des images de qualité sur des tissus biologiques. Cependant, il est vrai que le montage expérimental n'est pas optimal pour le moment.

C'est notamment l'alignement des lentilles GRIN qui est imparfait, tout particulièrement pour celles de diamètre 1 mm difficiles à manipuler, ce qui influe beaucoup sur les

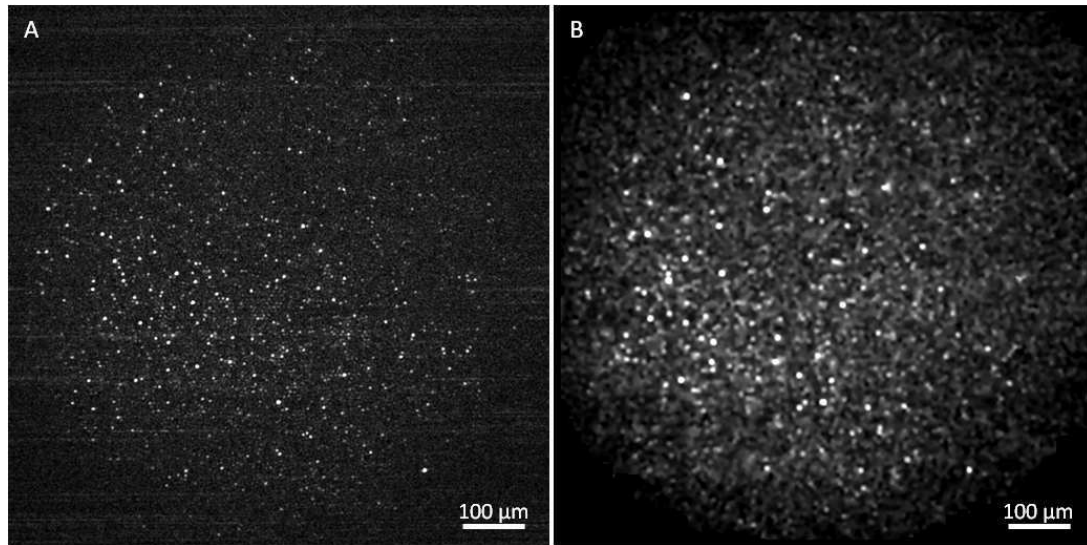


Figure 6.13 – Images de phantom (billes de TiO_2 dans une matrice de polyuréthane) brute (A) et avec traitement (B).

performances [121]. L'interféromètre de Linnik demande en effet déjà des réglages fins, qui doivent être encore plus précis avec la lentille supplémentaire. Il faudra concevoir une mécanique personnalisée pour bien maintenir et positionner la lentille. Au niveau de la sonde, la GRIN est collée manuellement par nos soins, ce qui fait que l'alignement est souvent imparfait et la distance entre le faisceau et la lentille imprécise. On pourra faire sous-traiter ce collage par les fabricants de fibres.

Nous avons aussi pensé à un autre type d'interféromètre contrôleur, une simple cavité de Fabry-Pérot (voir annexe A) formé par deux demi-lentilles GRIN de pitch 0.25 espacées par une huile optique de même indice, comme illustré sur la figure 6.14. Le faisceau de référence traverse simplement les deux lentilles. Le deuxième faisceau effectue en plus un aller-retour dans les lentilles : il est réfléchi sur R_1 , puis sur R_2 . Bien sûr il existe encore d'autres chemins plus longs à x aller-retours, ils interviennent dans le signal final mais leur intensité devient vite très faible car elle perd un facteur $R_1 R_2$ à chaque aller-retour supplémentaire. En ne considérant que les deux premiers trajets, la différence de marche est $\delta_c = 2 n_{\text{GRIN}} D_{\text{GRIN}} + 2 n_{\text{Huile}} e$. En plaçant l'une des lentilles sur un moteur ou un piézoélectrique, on pourrait balayer la profondeur e , et effectuer la modulation de phase. Les coefficients R_1 et R_2 pourraient être choisis pour optimiser le signal, en effectuant un dépôt de couche mince contrôlé.

Vitesse

La vitesse actuelle est trop faible : 1 image demande 5 secondes d'acquisition (avec un moyennage de 100 accumulations).

Cela n'est pas dû à la caméra, qui peut fonctionner à 150 Hz, mais au manque de lumière qui implique des temps d'exposition d'au moins 30 ms, et donc une fréquence effective de 30 Hz, pour atteindre une saturation correcte. Pourtant l'arc au Xénon est une source puissante, on mesure en sortie de fibre d'illumination une puissance totale de 800 mW dans la bande [200-2000 nm]. Comme on ajoute des filtres limitant la gamme

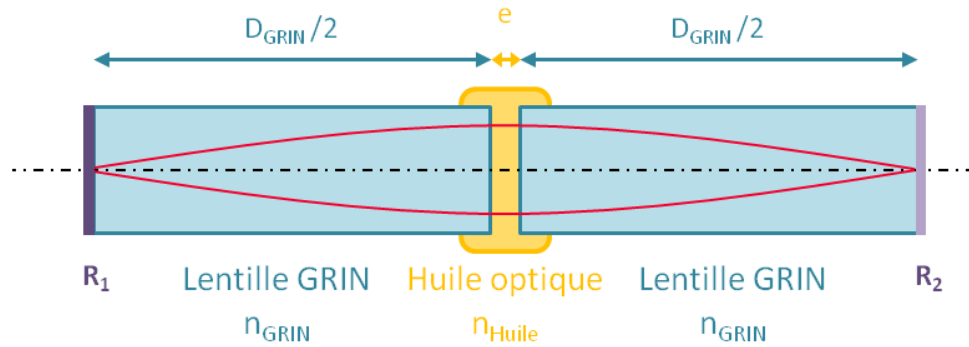


Figure 6.14 – Schéma d'un interféromètre contrôleur de type Fabry-Pérot avec deux lentilles GRIN.

à [700-800 nm] pour éviter les trop grands pics du spectre, la puissance diminue jusqu'à 60 mW. Le montage comprend deux séparatrices successives, ce qui diminue le flux d'un facteur 4. Mais ce sont surtout les pertes dans le faisceau qui sont considérables : nous avons mesuré un flux divisé par 6 après passage par le faisceau. Une grande partie de la lumière injectée dans le faisceau est en effet perdue dans la gaine.

Une solution est de disposer d'une source avec plus de puissance, mais toujours incohérente spatialement et temporellement. Nous pensons qu'il sera possible pour cela d'utiliser des LEDs à différentes longueurs d'ondes. Une LED émet en général un spectre relativement étroit, de l'ordre de 50 nm de large. En assemblant plusieurs LEDs on pourra obtenir une source assez puissante et à spectre assez large pour garantir le maintien de la faible épaisseur de coupe.

6.4.2 Conclusion

Nous avons apporté ici la preuve de principe d'un système d'imagerie FFOCT pour l'endoscopie flexible. Il s'affranchit du phénomène d'interférences parasites du faisceau de fibres grâce à un choix adapté d'interféromètres travaillant à de grandes différences de marche. Nous avons également proposé un traitement de dépixélisation des images qui est effectué simultanément à l'acquisition.

Il reste plusieurs améliorations essentielles à apporter au montage actuel pour disposer d'un véritable prototype utilisable dans le domaine biomédical, notamment en termes de sensibilité et de vitesse, mais nous avons proposé des pistes d'amélioration.

Nous pensons que la technique que nous proposons a le potentiel pour constituer, à terme, un véritable outil de microscopie endoscopique.

Troisième partie

L'imagerie par Tomographie de Cohérence Optique Plein Champ pour l'endoscopie rigide

Systèmes à endoscopes rigides pour l'OCT Plein Champ

Table des matières

7.1	Système de FFOCT en endoscopie rigide à deux interféromètres . . .	92
7.1.1	Détails du montage	92
7.1.2	Résultats et images	94
7.1.3	Discussion du montage	94
7.2	Système de FFOCT en endoscopie rigide à un interféromètre	96
7.2.1	Détails du montage	96
7.2.2	Imagerie <i>ex vivo</i> avec une sonde aiguille	98
7.2.3	Imagerie <i>in vivo</i> de la peau	100
7.2.4	Ajout du contraste d'élasticité au contraste optique	104
7.2.5	Discussion du montage	107
7.3	Discussion	108
7.3.1	Comparaison des deux approches	108
7.3.2	Conclusion	109

Nous nous intéressons dans ce chapitre à l'imagerie par endoscopie rigide. Comparée à une sonde flexible, une sonde rigide donne un accès direct non invasif à un nombre plus limité de zones : la peau, la cavité buccale, l'appareil uro-génital. Elle peut avoir accès aux organes internes dans le cadre d'opérations de chirurgie ouverte. Cependant, si l'endoscopie flexible permet effectivement d'atteindre les organes internes, il faut garder à l'esprit que la profondeur d'imagerie en OCT est intrinsèquement limitée au millimètre : on ne pourra donc imager que la paroi superficielle, et non l'intérieur de l'organe. Pour cela il faut pénétrer mécaniquement le tissu avec une aiguille, ou une sonde rigide assez fine. Un système d'imagerie avec sonde rigide permettra donc aussi d'imager des zones inaccessibles directement même par endoscopie flexible, comme l'intérieur du sein, du cerveau (en perçant l'os du crâne), ou encore du rein.

Les sondes rigides peuvent être composées d'un assemblage de micro-lentilles classiques montées dans un tube support, ou de lentilles GRIN qui ont déjà une forme cylindrique. Nous avons choisi pour cette étude d'utiliser des lentilles GRIN.

Nous avons expliqué au chapitre 4 l'intérêt d'utiliser un système à deux interféromètres pour l'OCT Plein Champ avec une sonde flexible. Ce système peut être implémenté avec tout type d'endoscope, y compris avec une sonde rigide comme nous allons le montrer dans une première partie.

Cependant on pourra aussi utiliser un système d'OCT Plein Champ avec un seul interféromètre. En effet, la question de l'intégrité du signal interférométrique au passage à travers les fibres optiques ne se pose plus avec une sonde rigide, on peut donc introduire une sonde dans chaque bras de l'interféromètre.

Nous allons proposer les deux systèmes, à deux interféromètres, puis à un seul, et nous comparerons leurs performances respectives afin de choisir le système d'imagerie le plus adapté.

7.1 Système de FFOCT en endoscopie rigide à deux interféromètres

7.1.1 Détails du montage

Montage

Nous utilisons le même principe de montage que celui proposé au chapitre 6 en l'adaptant à notre sonde rigide. Nous travaillons toujours avec de grandes différences de marche de manière à s'affranchir, non plus des signaux d'interférence parasites qui ne sont plus présents, mais du phénomène de modulation d'intensité. Un schéma du montage est présenté sur la figure 7.1.

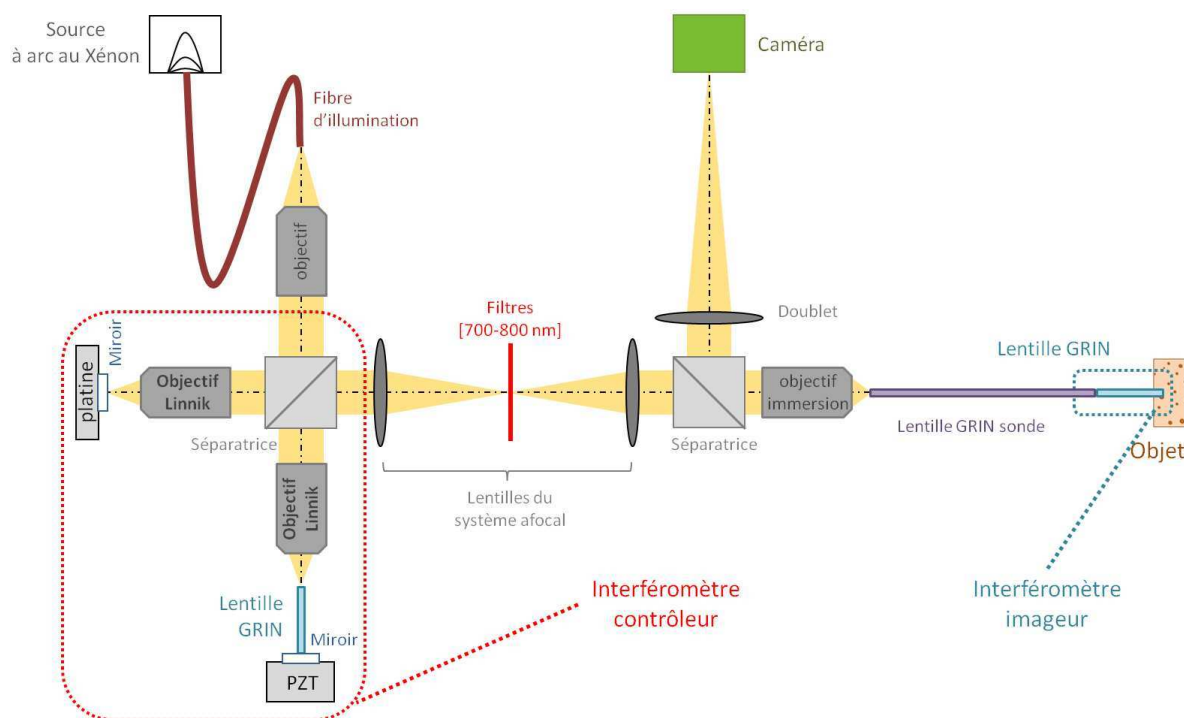


Figure 7.1 – Schéma du montage d'OCT Plein Champ en endoscopie rigide à deux interféromètres.

La source est un arc au Xénon, couplé dans une fibre optique de diamètre 1 mm et de NA 0.22. Un objectif de microscope d'illumination, x10 de NA 0.3, injecte ensuite la lumière dans l'interféromètre contrôleur.

L'interféromètre contrôleur comprend un cube séparateur, deux objectifs x10 de NA 0.3, deux miroirs en argent totalement réfléchissants, une platine piézoélectrique, une platine de translation (KT-LS28-M, Zaber). On introduit ici une lentille GRIN de diamètre 2 mm, longueur 50 mm, NA 0.1, Pitch 0.5 (voir annexe A) (GT-IRFL-200-050-11-NC, GRINTech).

En sortie, un système afocal de deux lentilles de focale 100 mm permet de conjuguer les pupilles de l'objectif d'illumination et de l'objectif d'injection dans le faisceau de fibre. On place également deux filtres passe-haut et passe-bas pour ne garder que les longueurs d'onde entre 700 et 800 nm.

L'objectif d'injection dans la sonde est un x10, NA 0.3, à immersion dans l'eau. La sonde est constituée d'une longue lentille GRIN, dite 'relais', de diamètre 2 mm, longueur 100 mm, NA 0.1, Pitch 1 (GT-IRFL-200-100-11-NC, GRINTech) (figure 7.2). Les lentilles GRIN présentant des phénomènes de biréfringence [122] [123], nous n'avons pas utilisé de dispositif à polarisation dans ce montage. L'utilisation d'un objectif à immersion permet de réduire la réflexion parasite sur la face avant de la sonde. En pratique nous avons utilisé du gel aqueux (Aquasonic) comme milieu d'immersion.

La lentille GRIN pour l'imagerie, similaire à celle de l'interféromètre contrôleur, est accolée au bout de la lentille GRIN relais, ou collée avec des colles optiques (MY-133-MC, MyPolymers ou EP30MED, Masterbond). L'interface entre la lentille GRIN relais et la lentille GRIN étant la référence de l'interféromètre imageur, on choisit le coefficient de réflexion sur la face d'entrée de la GRIN de manière à ce que la référence soit supérieure

à la lumière incohérente. Nous avons fait déposer une fine couche de diélectrique pour obtenir un coefficient de réflexion de 12 %.

Un doublet de focale 150 mm focalise l'image sur le détecteur. Il s'agit d'une caméra CMOS de 1024*1024 pixels pouvant fonctionner à 150 Hz (PHF-MV-D1024E-160-CL-12, Photonfocus).

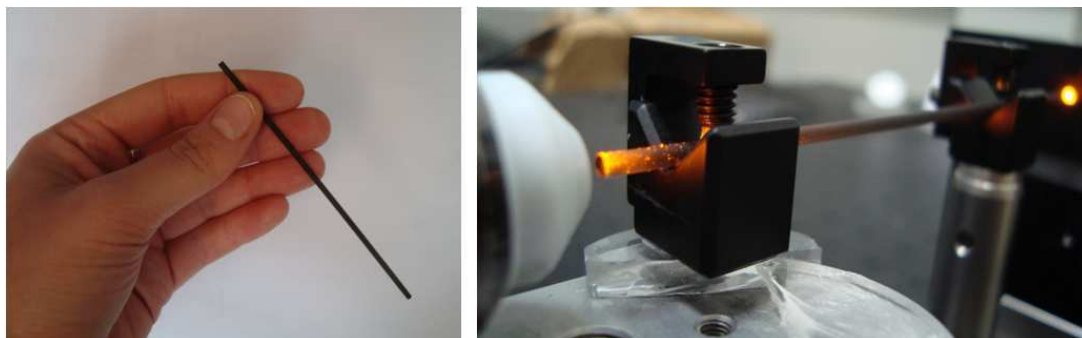


Figure 7.2 – Détail de la lentille GRIN relais de 100 mm.

Performances

Les résolutions obtenues sont 1.8 μm axiale et 3.5 μm transversale (mesurée sur une mire), pour un champ de 1.6 mm * 1.6 mm.

La sensibilité est évaluée à -72 dB à 20 accumulations, elle est déduite du signal-sur-bruit mesuré expérimentalement sur une lame de verre.

7.1.2 Résultats et images

Images d'échantillons modèles

La figure 7.3 présente des images d'abord obtenues sur des objets non biologiques : un phantom (billes de TiO_2 dans une matrice de polyuréthane), et une feuille de papier. On distingue clairement les billes rétrodiffusantes du phantom, et les fibres entremêlées du papier.

Images d'échantillons biologiques

Nous avons également pu imager des échantillons biologiques *ex vivo*, notamment du sein comme présenté sur la figure 7.4. On observe du tissu fibreux fortement rétrodiffusant (en blanc) contenant des adipocytes, les cellules graisseuses, dont la gouttelette lipidique ne rétrodiffuse pas (disques noirs). L'image est moyennée 100 fois.

7.1.3 Discussion du montage

Sensibilité et vitesse

Nous retrouvons les mêmes limitations de sensibilité que pour le montage avec sonde flexible exposé au chapitre 6. Nous avons discuté des moyens d'améliorer cette situation en optimisant la conception mécanique du montage (voir page 85).

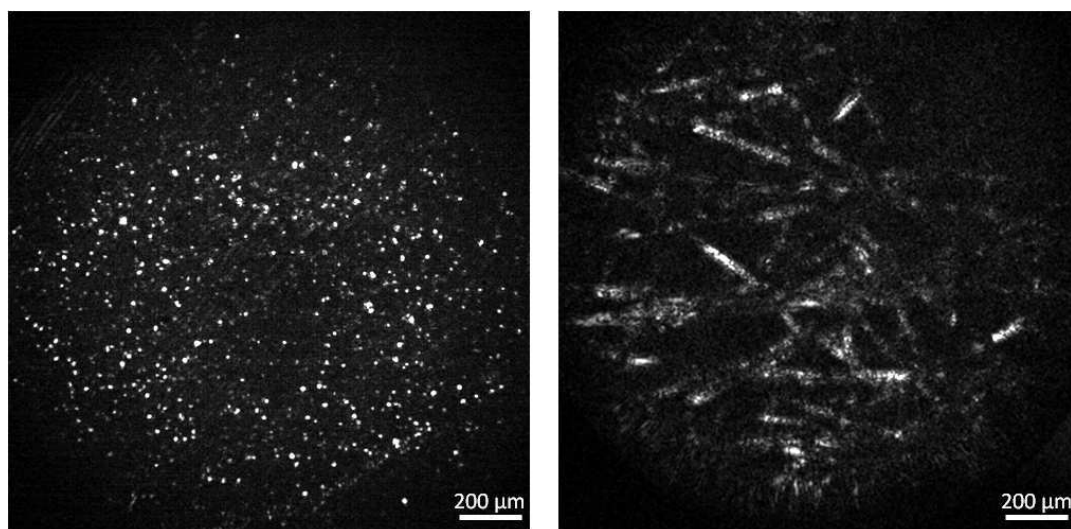


Figure 7.3 – Images du phantom (gauche) et de papier (droite).

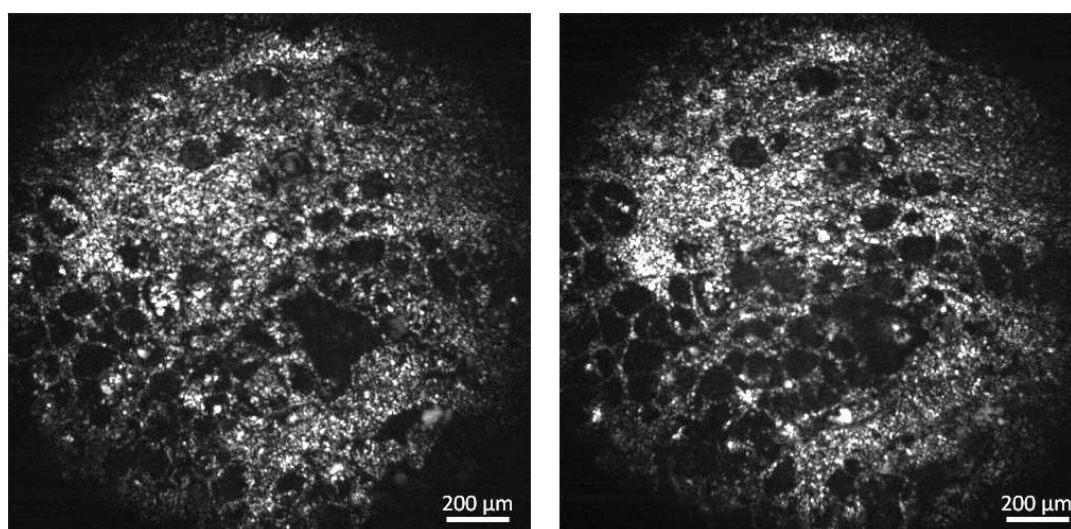


Figure 7.4 – Image de sein, profondeurs 20 μm et 30 μm .

Les pertes de lumière dans le montage sont importantes : la puissance en sortie de la sonde rigide est de 0.7 mW dans la gamme [700-800 nm] alors que la puissance d'entrée dans le montage s'élève à 60 mW. Cependant le temps d'exposition sur la caméra nécessaire pour atteindre un niveau de saturation correcte est de 5 ms, ce qui n'est pas trop élevé et permet de travailler à la fréquence maximale de la caméra, 150 Hz. Comme il faut ensuite moyenner sur 50 voire 100 accumulations pour augmenter le rapport signal-sur-bruit et obtenir une bonne qualité d'image, la fréquence d'imagerie effective est de seulement 0.5 fps. En augmentant la sensibilité du système, le nombre d'accumulations nécessaires pour obtenir une image de bonne qualité diminue, et qui permet d'augmenter la vitesse d'imagerie.

Portabilité de la sonde

Notre montage actuel est entièrement fixé sur une table optique. On peut donc imager des échantillons *ex vivo* placés à l'extrémité de la sonde, ou encore des zones de la peau facile d'accès comme le bras ou le visage. Pourtant il sera nécessaire de disposer d'une sonde portable dans la perspective d'effectivement imager *in situ*.

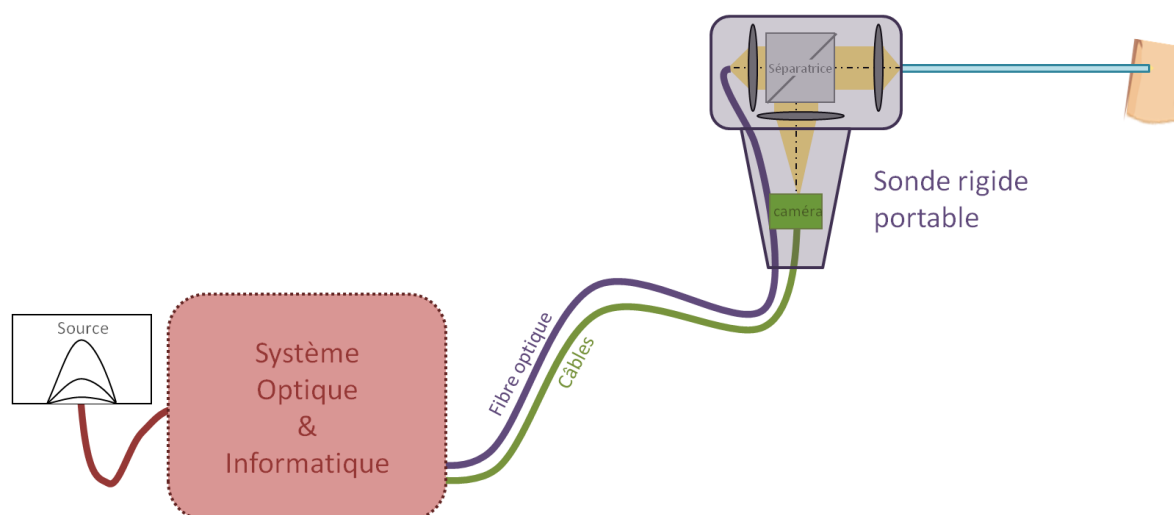


Figure 7.5 – Schéma d'un appareil de FFOCT à deux interféromètres avec sonde rigide portable à la main.

Il faut donc concevoir un système où la sonde rigide serait portable, sous la forme d'une sorte d'une tête d'imagerie ou d'un pistolet, comme proposé sur la figure 7.5. Pour cela, nous pensons détacher la partie du montage comprenant la sonde, la caméra et la séparatrice, du reste du système optique. La liaison entre l'interféromètre contrôleur et la sonde portable se fait par une fibre optique, dans laquelle on injecte le spectre cannelé de contrôle.

7.2 Système de FFOCT en endoscopie rigide à un interféromètre

7.2.1 Détails du montage

Nous proposons ici d'utiliser directement le principe de l'OCT Plein Champ (exposé en 2.3.2 page 23) en insérant une sonde rigide dans chaque bras de l'interféromètre de Linnik.

Montage

Le principe du montage est exposé sur la figure 7.6, et illustré sur la figure 7.7

La source est une halogène (KL 1500 compact, Schott), couplée dans un faisceau de fibres de diamètre 3 mm et de NA 0.3 (155 101, Schott).

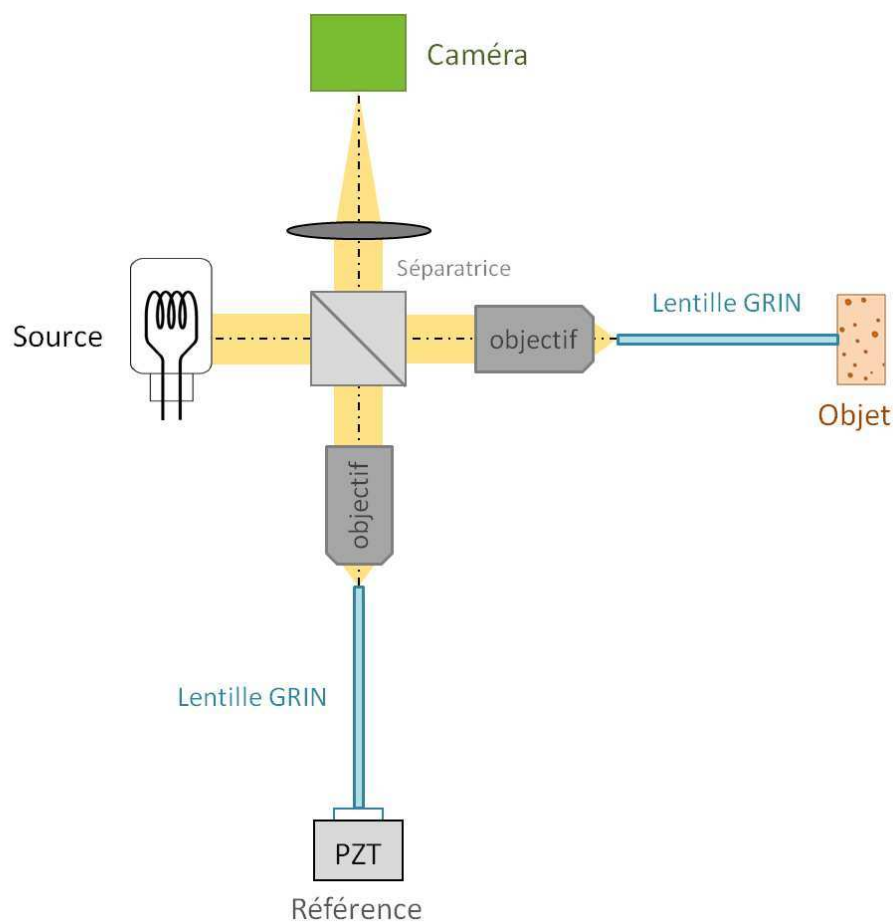


Figure 7.6 – Schéma du montage d'OCT Plein Champ en endoscopie rigide à un interféromètre, non compact.

Un cube séparateur divise la lumière entre le bras objet et le bras de référence. Les deux bras contiennent des objectifs de microscope x10 de NA 0.3, à immersion. Le bras de référence motorisé (T-NA08A25, Zaber) contient un miroir en silicium, de coefficient de réflexion dans l'huile 20 %, monté sur une platine piézoélectrique (STr-25/150/6, PiezoMechanics).

Dans chaque bras, deux lentilles GRIN sont placées devant chaque objectif. Ces lentilles ont un diamètre de 2 mm, une longueur de 50 mm, un NA de 0.1, un Pitch de 0.5 (GT-IRFL-200-100-11-NC, GRINTech). Les faces d'entrée des lentilles, ainsi que la face de sortie de la lentille de référence, sont immergées dans de l'huile optique de silicone (Dow corning Q7-9120, Biesterfeld), afin de minimiser les réflexions parasites sur ces surfaces.

En sortie de la séparatrice, un doublet de focale 150 mm ou 250 mm focalise l'image sur le détecteur. On place également deux filtres, un passe-haut et un passe-bas, pour ne garder que les longueurs d'onde entre 650 et 1100 nm. La caméra est un détecteur CMOS de 1024*1024 pixels pouvant fonctionner à 150 Hz (PHF-MV-D1024E-160-CL-12, Photonfocus).

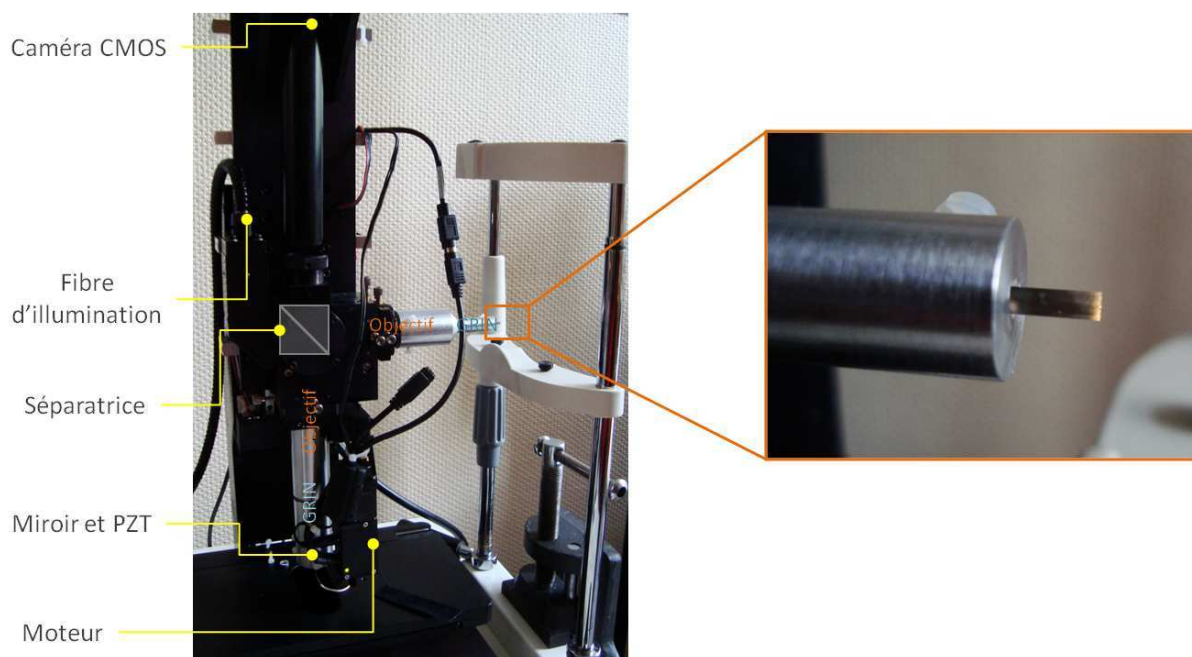


Figure 7.7 – Montage d'OCT Plein Champ en endoscopie rigide à un interféromètre, non compact.

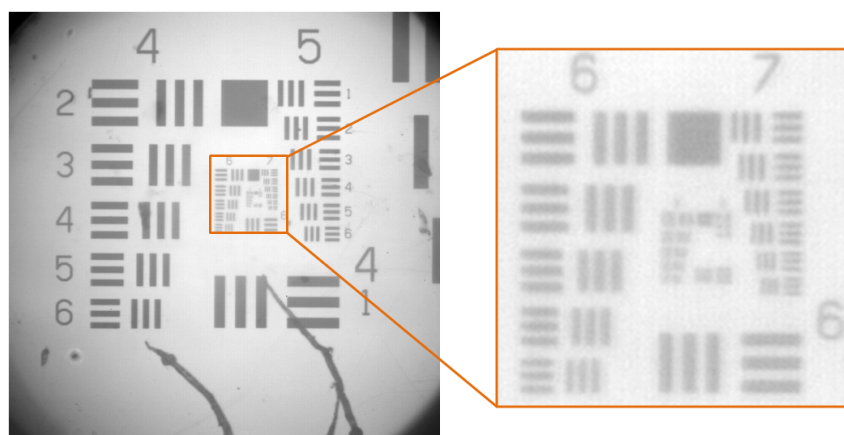


Figure 7.8 – Image d'une mire (USAF 1951 haute-résolution, Edmund Optics).

Performances

Les résolutions obtenues sont $1.8 \mu\text{m}$ axiale et $3.7 \mu\text{m}$ transversale (mesurée sur une mire 7.8), pour un champ de $1.7 \text{ mm} \times 1.7 \text{ mm}$ (doublet de focalisation de 150 mm) ou de $0.9 \times 0.9 \text{ mm}$ (doublet de focalisation de 250 mm).

La sensibilité est évaluée à -80 dB à 20 accumulations, elle est déduite du rapport signal-sur-bruit mesuré expérimentalement sur une lame de verre.

7.2.2 Imagerie *ex vivo* avec une sonde aiguille

Nous avons déjà discuté de l'intérêt de disposer d'une sonde rigide pour imager l'intérieur des organes. On peut utiliser notre sonde cylindrique soit directement comme une aiguille, soit en l'insérant dans une aiguille hypodermique, ce qui est illustré sur la figure 7.9. Sur le système présenté ici nous utilisons une lentille sonde de diamètre de 2 mm pour

des raisons de maniabilité du montage, mais il est possible d'obtenir des longues lentilles GRIN à des diamètres de 1 mm et jusqu'à 0.5 mm.

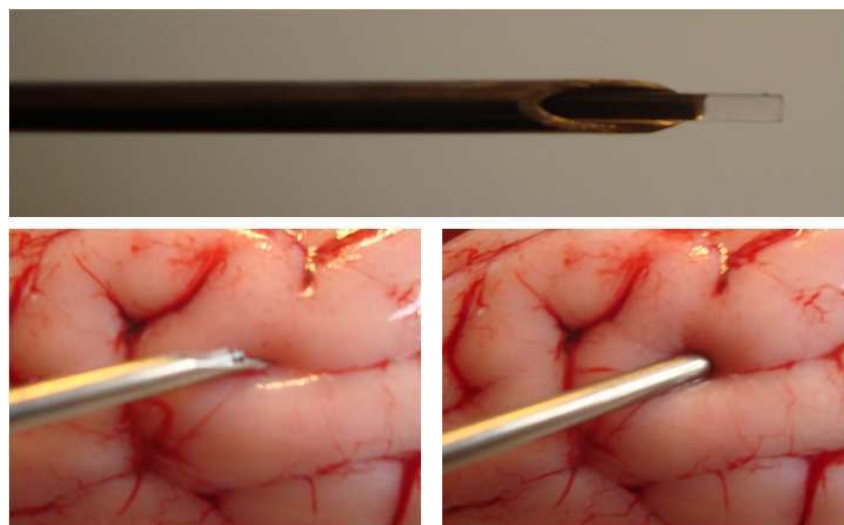


Figure 7.9 – Détail d'une lentille GRIN insérée dans une aiguille pour pénétrer l'organe, exemple avec de la cervelle de veau.

Nous avons imagé différents échantillons d'organes *ex vivo*.

Sein

La figure 7.10 présente des images de tissus de sein. On reconnaît le tissu de soutien fibreux et les adipocytes à la forme caractéristique.

Cerveau

Nous avons imagé un échantillon de cerveau (hippocampe) frais en le pénétrant avec la lentille nue comme avec une aiguille (figure 7.11). Les images du tissu, à une profondeur de typiquement 50 μm en avant de la sonde, sont acquises au cours de l'insertion de la sonde et de son retrait. La sonde est déplacée à vitesse lente, 1 mm/s, et arrêtée lors de l'acquisition des images. On note que le tissu reste bien collé à la surface de la lentille lors de son insertion, et qu'il se recolle partiellement après son retrait : on observe au centre de l'image (D) le trou laissé par le passage de la sonde.

Le signal détecté est assez important, cependant il est difficile de bien distinguer des structures sur ces images. En connaissant a priori les images attendues (figure 2.16 page 29), on est capables de reconnaître quelques fibres de myéline et des corps cellulaires de neurones. On sait que le diamètre de ces fibres est inférieur à 1 μm [124] ce qui est plus faible que la résolution de notre système. Cependant nous pourrions utiliser des lentilles d'ouverture numérique plus grande, 0.2 ou 0.3, de manière à augmenter la résolution ainsi que l'angle solide de collection de la lumière, et donc le niveau de signal, ce qui nous permettra d'obtenir de meilleures images pour le cerveau.

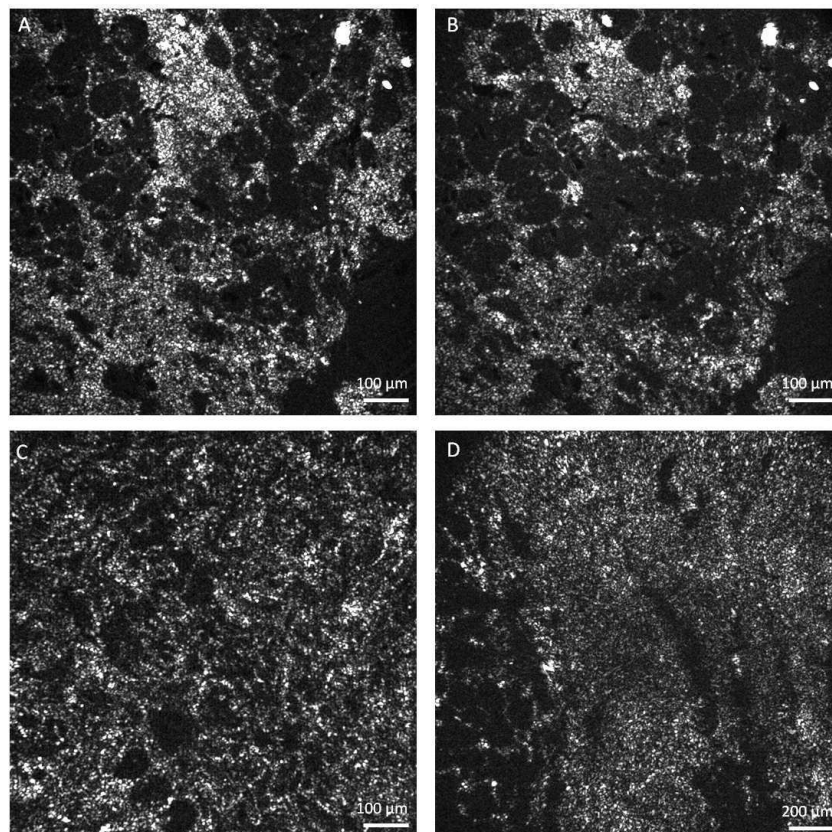


Figure 7.10 – Images *ex vivo* d'échantillon de sein fixé, avec une sonde aiguille. Zone grasseuse contenant de nombreux adipocytes, à la profondeur 60 μm (A) et 80 μm (B). Zones fibreuses avec quelques adipocytes, profondeur 50 μm (C) (D).

Rein

Nous avons imagé un rein de rat *ex vivo* fixé, entier, en le pénétrant avec la lentille nue comme avec une aiguille. Des images sont présentées sur la figure 7.12. Nous pensons avoir pénétré dans le cortex rénal, on observe des structures avec une lumière interne qui pourraient être des glomérules.

7.2.3 Imagerie *in vivo* de la peau

Nous avons également utilisé notre système à sonde rigide pour l'imagerie *in vivo* de la peau. La sonde ne pénètre pas comme une aiguille, elle est appliquée au contact du tissu.

Procédure

Une difficulté de l'imagerie *in vivo* est de suffisamment stabiliser le tissu pendant le temps d'acquisition pour éviter des artefacts sur l'image. Le tissu peut bouger à cause des mouvements macroscopiques conscients du sujet, mais aussi de la respiration, et des battements du coeur.

Une solution, utilisée par certaines équipes en microscopie confocale [19] ou en OCT [48], consiste à placer un anneau sur la zone à imager à l'aide d'adhésif. La peau est ensuite enduite de gel ou d'huile et une lame de verre est pressée sur le tissu. Cela s'est révélé

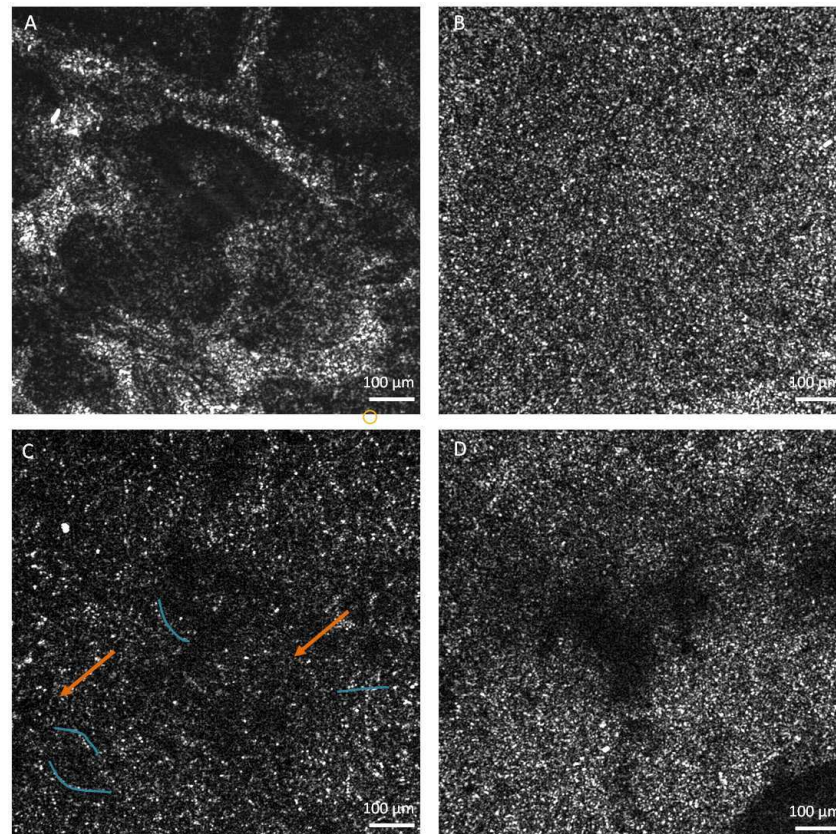


Figure 7.11 – Images d'échantillon d'hippocampe frais *ex vivo*, profondeur 20 μm (A) et 50 μm (B) (C) (D), prises en insérant la sonde (A) (B) (C), puis en la retirant (D). On devine des fibres de myéline (traits bleus) et des corps cellulaires de neurones qui apparaissent comme des petites taches noires (flèches orange).

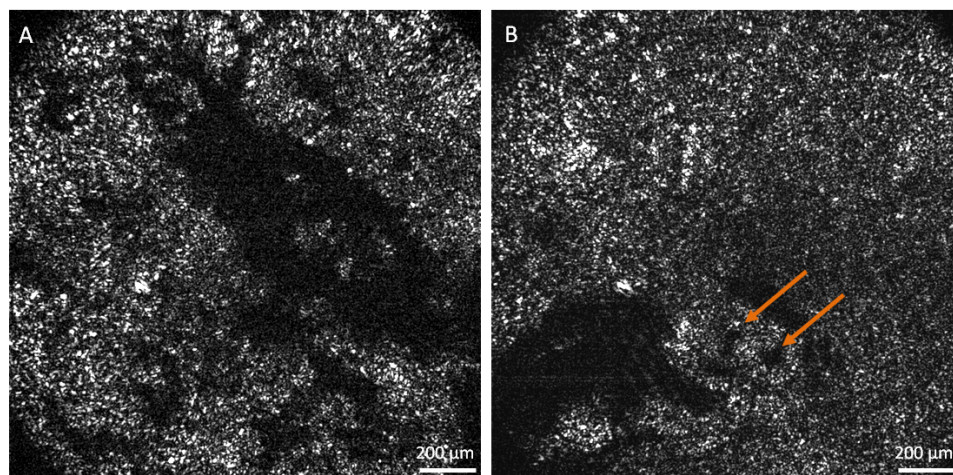


Figure 7.12 – Images d'échantillon de rein de rat fixé *ex vivo*, pénétré avec une sonde aiguille, profondeur 30 μm (A), 50 μm (B). On observe des glomérules (flèches oranges).

efficace pour enregistrer une image à une profondeur, mais pas assez pour imager tout un volume.

Ici nous avons recouvert la zone avec du gel aqueux, placé la sonde en contact avec la peau, et appliqué une légère pression. Nous avons trouvé que cela était suffisant pour

stabiliser le tissu pendant l'imagerie, même pour un volume entier. Le gel (Aquasonic), d'indice proche de l'eau, est celui utilisé couramment pour l'échographie ultrasonore. Il n'est pas obligatoire dans la procédure mais permet d'assurer un contact intime entre la sonde et le tissu. La présence de bulles d'air résiduelles piégées induirait en effet de fortes réflexions à l'interface et dégraderait la qualité d'image.

Images de peau *in vivo*

La figure 7.13 montre des résultats d'imagerie sur l'épiderme du visage, lèvres et joue. On distingue bien les cellules épithéliales dans le Stratum Spinosum, qui se situe sous le Stratum Corneum (couche cornée).

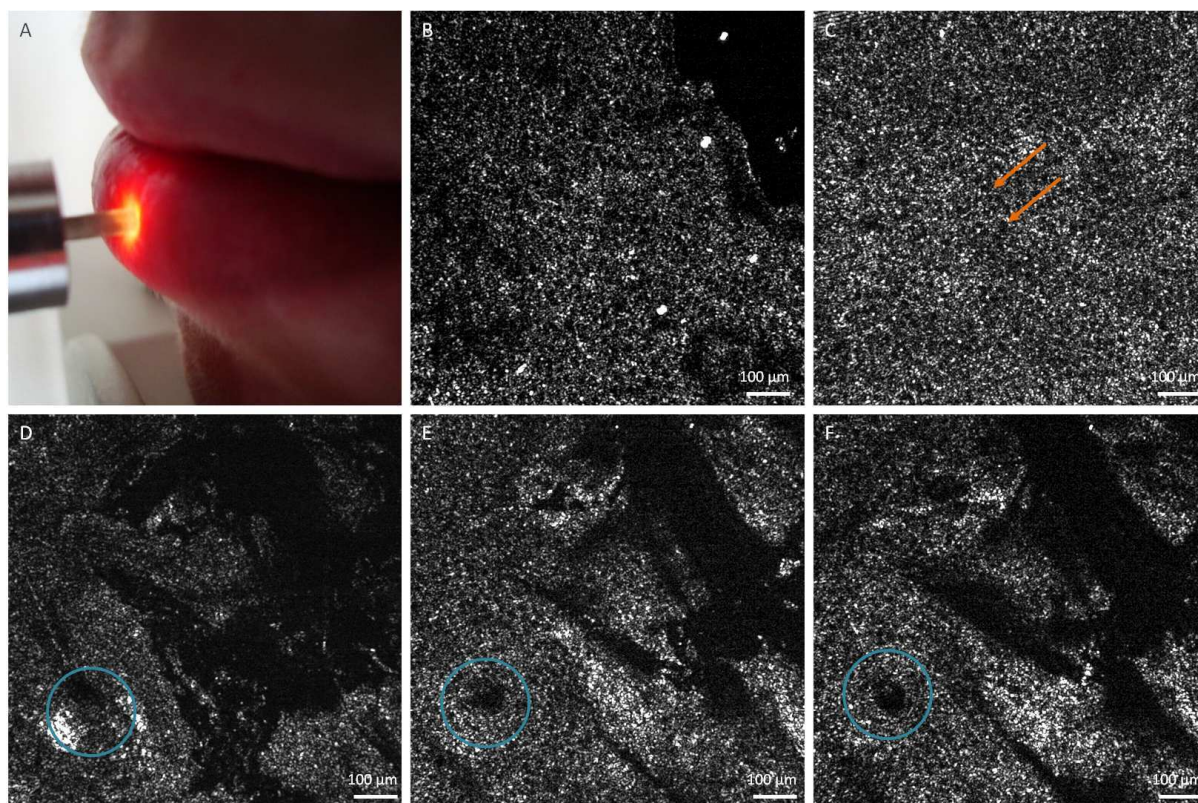


Figure 7.13 – Images de peau *in vivo* sur le visage. La sonde est simplement mise en contact avec la peau (A). Epiderme de la lèvre externe à la profondeur 20 μm (B) et 60 μm (C) avec cellules épithéliales (flèches orange). Epiderme de la joue aux profondeurs 20 μm (D), 60 μm (E), 70 μm (F), avec cellules épithéliales et follicule pileux (cercles bleus).

Nous avons imagé deux jeunes volontaires, femme et homme, au niveau de l'avant-bras (figure 7.14). Nous avons remarqué que la couche cornée était deux fois plus épaisse chez le volontaire masculin.

Nous nous sommes également intéressés à imager un grain de beauté (figure 7.15). Nous avons pu révéler des structures fibreuses totalement différentes de celle du tissu normal, et une absence de cellules épithéliales.

La profondeur maximale d'imagerie que nous avons pu atteindre se situe entre 100 μm et 250 μm suivant les zones. La figure 7.16 présente des images prises sur la peau fine de

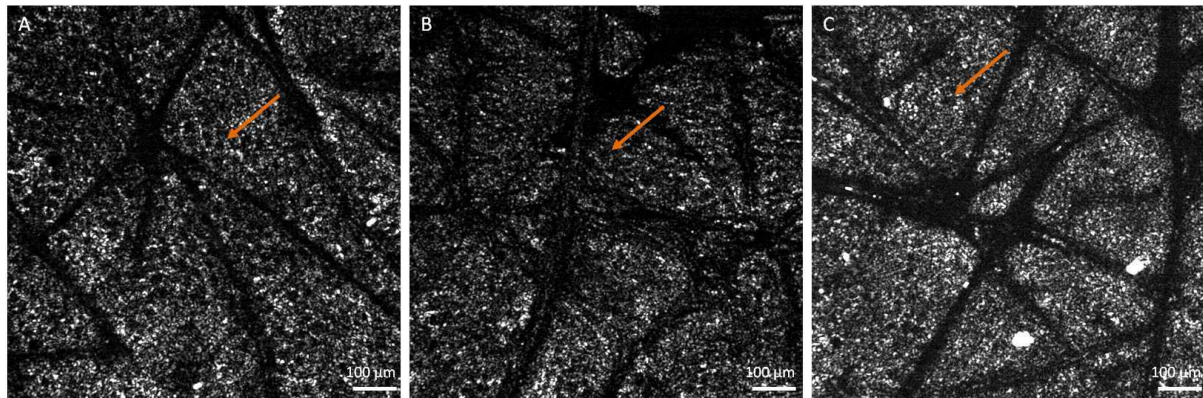


Figure 7.14 – Images de peau *in vivo* sur le bras, dans l'épiderme à 20 μm de profondeur, sur une jeune volontaire (A) (B) et un jeune volontaire (C).

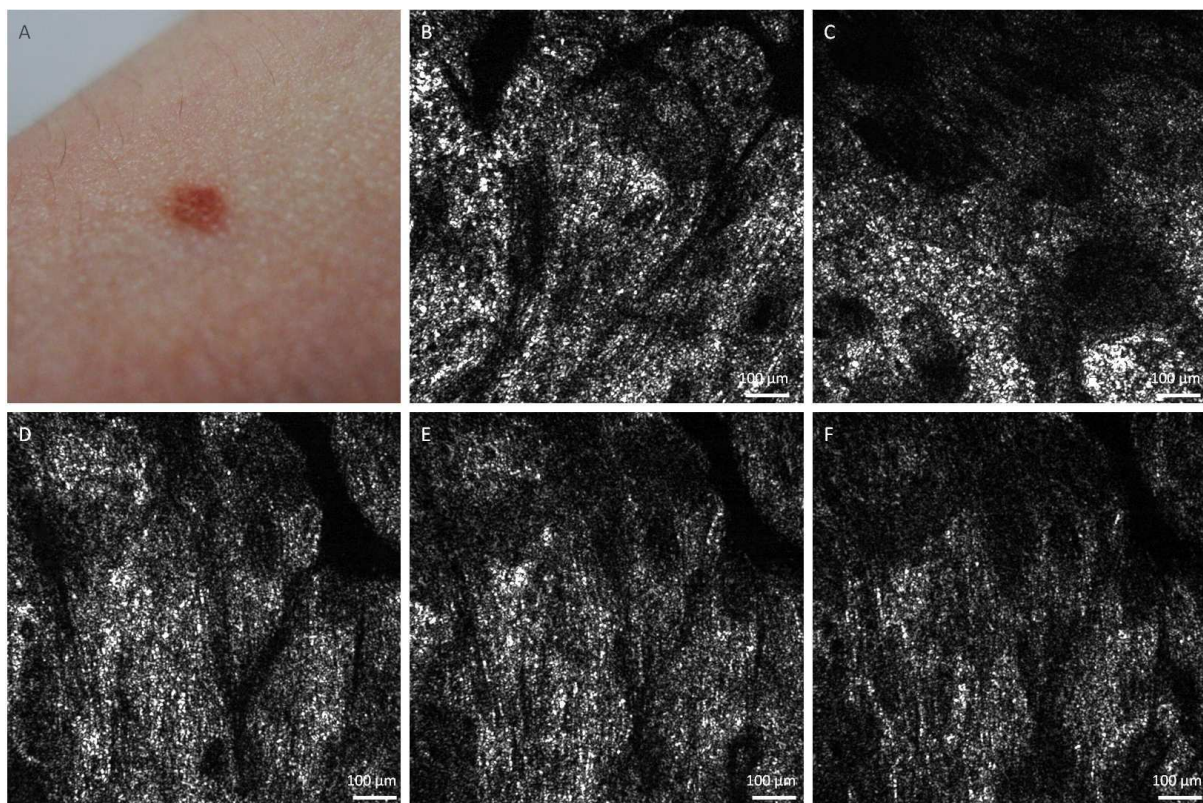


Figure 7.15 – Images de peau *in vivo* sur le bras au niveau d'un grain de beauté (A), sur différentes zones dans l'épiderme. Centre, profondeur 10 μm (B). Centre, profondeur 20 μm (C). Périphérie, profondeurs 10 μm (D), 20 μm (E), 30 μm (F).

l'avant-bras entre 20 μm et 200 μm de profondeur. On reconnaît les différentes couches de l'épiderme, jusqu'à la jonction épiderme-derme et la partie superficielle du derme. Le derme présente des réseaux de fibres de collagène rétrodiffusantes, et de larges zones noires correspondant aux papilles dermiques.

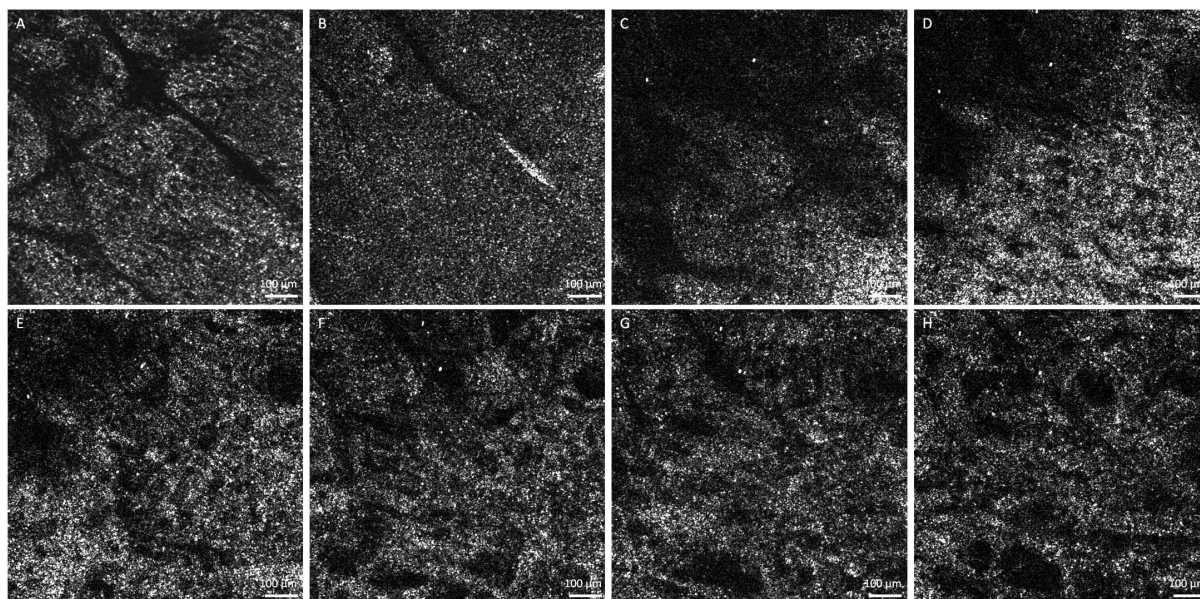


Figure 7.16 – Images de peau *in vivo* sur le bras, balayage d’une zone à différentes profondeurs : Stratum Spinosum à 20 μm (A), Stratum Granulosum à 40 μm (B), Jonction épiderme-derme à 100 μm (C) et 120 μm (D), Derme à 140 μm (E), 150 μm (F), 180 μm (G) et 200 μm (H).

7.2.4 Ajout du contraste d’élasticité au contraste optique

Nous avons voulu apporter un contraste supplémentaire à nos images d’OCT, l’élasticité du tissu. En effet, le contraste d’élasticité peut constituer une puissante aide au diagnostic, car les caractéristiques mécaniques des tissus, des cellules et/ou de leur environnement sont modifiées par certaines pathologies, dont les tumeurs [125]. Ainsi le dépistage classique du cancer du sein consiste pour le médecin en une palpation manuelle de l’organe, pour déterminer qualitativement l’élasticité du tissu et détecter des éléments plus durs potentiellement pathologiques.

L’élastographie a déjà été couplée à différentes modalités d’imagerie biomédicales notamment en acoustique et en imagerie par résonance magnétique [126] [127]. Elle commence à être adaptée pour l’OCT [128]. Nous avons collaboré dans ce cadre avec Amir Nahas, qui effectue son doctorat à l’Institut Langevin sur l’élastographie en OCT Plein Champ, pour ajouter le contraste d’élasticité à notre système d’imagerie à endoscope rigide.

Principe de l’élastographie statique

Lorsque le milieu est soumis à une contrainte, celui-ci se déforme. La loi de Hooke décrit ce phénomène en reliant la contrainte unidirectionnelle σ à la déformation ε par $\sigma = E \cdot \varepsilon$, où E est le module d’Young et caractérise l’élasticité du milieu. Cette loi est valable dans un milieu incompressible, uniforme, isotrope, de réponse élastique linéaire. Elle n’est donc pas toujours exacte dans le cas des tissus biologiques hétérogènes, souvent anisotropes, qui ont une réponse à la fois élastique et visqueuse. Cependant pour des petites déformations elle constitue une approximation valable et donne des résultats qualitatifs déjà pertinents

[129].

L'élastographie statique, proposée en 1991 [130], repose sur cette relation. Lorsque la matière est faiblement comprimée, les zones molles se déforment davantage que les zones plus dures. En mesurant la carte des déformations et en résolvant le problème inverse, on peut obtenir la carte des modules d'Young du milieu, en échelle qualitative.

Afin d'estimer le déplacement local dans l'échantillon lorsqu'il est comprimé, on calcule l'intercorrélation entre les images avant et après compression. Ainsi, on obtient une cartographie des déplacements locaux. Le calcul du gradient de ce champ de déplacement nous donne accès à la déformation, qui est donc proportionnelle au module de Young en régime élastique. Cette opération peut se faire en 2D ou en 3D.

Adaptation à l'endoscopie rigide

Un montage d'OCT de Fourier non imageur avec aiguille rigide pour l'élastographie a déjà été proposé [105]. L'aiguille est insérée dans le tissu et l'imagerie se fait dans la direction axiale en avant de la sonde. Le profil de déplacement axial est obtenu par mesure du décalage de phase Doppler.

Ici nous utilisons notre sonde rigide de diamètre 2 mm dont l'extrémité est plate, ce qui augmente la pression sur l'objet comparé à une extrémité de forme pointue [131] [132]. Nous enregistrons une image 3D de l'objet, puis déplaçons la sonde très faiblement, de l'ordre de 20 μm , pour enregistrer l'image 3D après compression.

La figure 7.17 montre la carte 2D en section des déplacements sur un phantom de billes d'oxyde de zinc ZnO dans un polymère PDMS (PolyDiMéthylSiloxane). Il est composé de 3 couches de mêmes propriétés optiques mais d'élasticités différentes, la fraction de polymère utilisé permettant de contrôler l'élasticité du phantom.

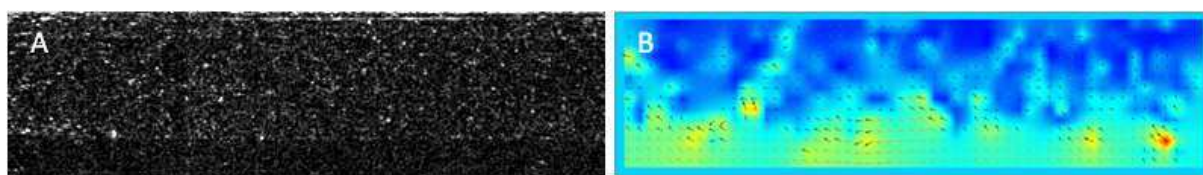


Figure 7.17 – Image en coupe du phantom et carte des déplacements associée (logiciel PivLab).

Résultats sur des échantillons biologiques *ex vivo*

Nous avons également imagé des tissus biologiques *ex vivo*, notamment des échantillons frais d'oreilles de souris. On voit sur la figure 7.18 la coupe en section verticale de l'échantillon. Pour des raisons de temps de traitement, les calculs élastrographiques sont effectués sur une partie de l'image seulement. La carte des déplacements n'apporte pas ici d'informations, mais la carte des déformations associée révèle des zones d'élasticités différentes que l'on peut retrouver sur l'image optique.

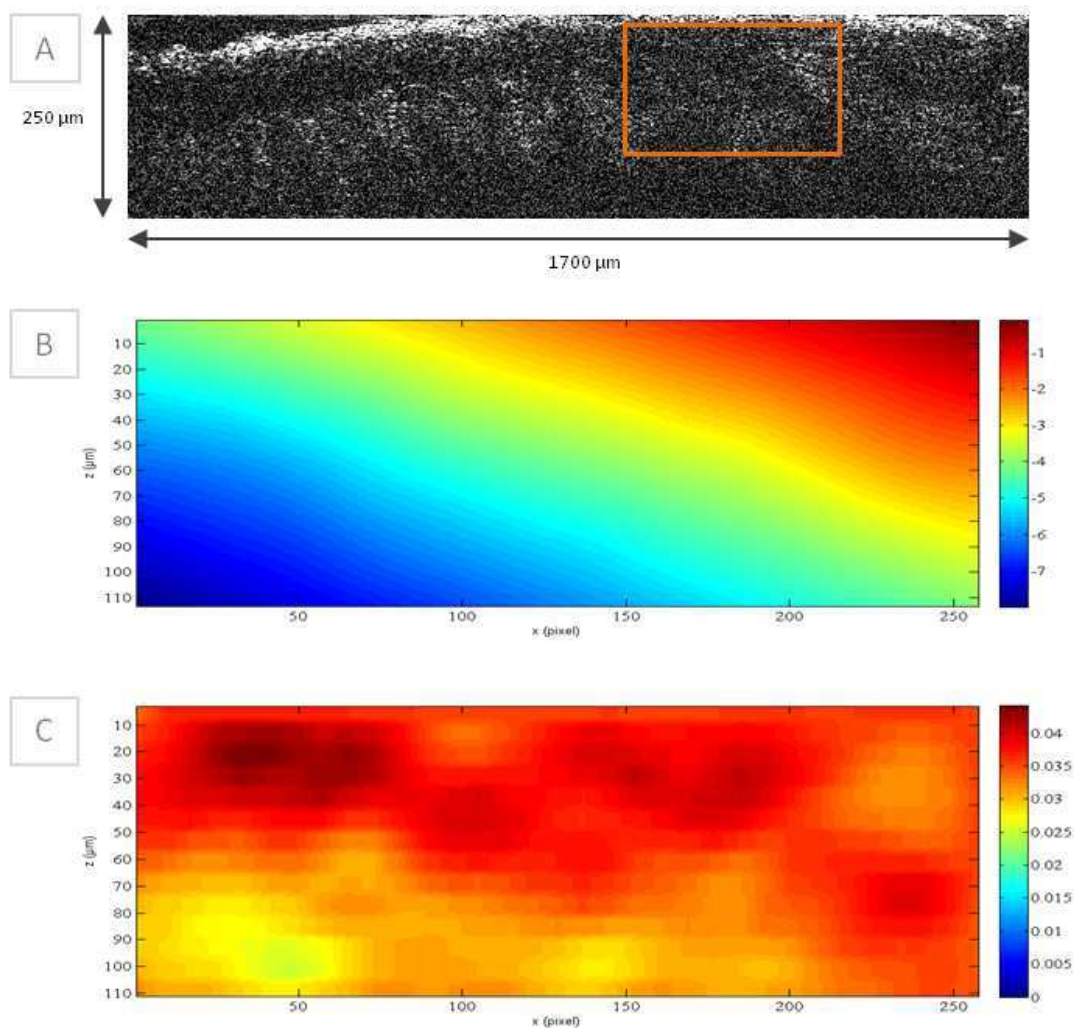


Figure 7.18 – Image en coupe d'un échantillon frais d'oreille de souris *ex vivo* (A), carte des déplacements associée (échelle en pixels) (B), et carte des déformations (échelle qualitative) (C). 1 pixel = 1.7 μm .

Conclusion

Ces résultats préliminaires sont prometteurs pour l'intégration de l'élastographie à la FFOCT avec sonde rigide. Les calculs sont effectués pour le moment sur une section axiale 2D, mais pourront se faire sur le volume entier en calculant les intercorrélations en 3D. Une collaboration est en cours sur ce sujet avec l'équipe du Dr Stéphane Roux de l'ENS Cachan. L'introduction d'un traitement en 3D améliorera significativement la qualité des cartes d'élasticité, en prenant en compte les déplacements latéraux qui créent des décorrélations trop importantes pour les calculs 2D.

La principale limitation de cette méthode est la vitesse d'acquisition. Il faut enregistrer deux piles entières d'images en 3D, soit 200 images, ce qui demande au moins 4 minutes avec notre système actuel. Obtenir les cartes de corrélations 3D est également gourmand en temps de calcul, puisque cela demande 30 minutes, et est donc réalisé séparément, après l'acquisition des images. L'implémentation de ce traitement sur un processeur graphique GPU ('Graphic Processing Unit') permettrait de réduire considérablement la durée de

calcul.

D'autres approches d'élastographie, notamment avec excitation dynamique [133] [134], pourront être envisagées afin d'obtenir des cartes d'élasticité quantitatives.

7.2.5 Discussion du montage

Notre montage à sonde rigide est déjà opérationnel, il a été démontré *in vivo*. Cependant ses performances peuvent encore être améliorées, ainsi que la conception de la sonde, en vue de proposer un véritable prototype utilisable par les médecins ou les chercheurs.

Performances

Vitesse L'obtention d'une image moyennée 20 fois, pour obtenir une sensibilité de -80 dB, demande 1 s avec la caméra actuelle. Pour certains objets moins contrastés il faut moyenner 50 fois soit presque 3 s. Pour opérer en temps réel il faut donc augmenter la vitesse d'acquisition d'un facteur 10. Il est possible d'un côté d'utiliser une caméra fonctionnant à une cadence plus élevée que 150 Hz. D'un autre côté, augmenter la sensibilité du système permettra de réduire le nombre d'accumulations nécessaires. Sur ce point nous envisageons des améliorations sur la mécanique et l'alignement des composants optiques.

Sensibilité Nous avons voulu comparer la qualité d'image obtenue avec notre montage avec celle de l'appareil de FFOCT non endoscopique. Nous avons pour cela imagé un échantillon de sein *ex vivo* avec les deux systèmes, en se plaçant sur les mêmes zones et à la même profondeur, comme on peut le voir sur la figure 7.19.

Les zones A et B sont similaires mais non identiques, tandis que les images C et D correspondent exactement à la même zone de l'échantillon. Les résultats restent comparables, mais, comme nous nous y attendions, les images endoscopiques sont de moins bonne qualité. Cela est dû à une sensibilité plus faible, ainsi qu'à une résolution transversale trois fois plus élevée : $3.7 \mu\text{m}$ au lieu de $1.3 \mu\text{m}$. En effet, l'ouverture numérique de la lentille GRIN est de 0.1, au lieu de 0.3.

Profondeur Nous avons choisi un NA assez bas de manière à obtenir une profondeur de champ assez grande, de l'ordre de $100 \mu\text{m}$. En effet, la profondeur du plan d'imagerie est contrôlée en balayant la différence de marche entre les deux bras, mais la profondeur du plan focal est fixe et ne peut être déplacée en même temps. Une profondeur de champ élevée permet de garder des images assez bien focalisées sur des profondeurs pertinentes pour l'OCT. Nous avons ainsi pu imagier *in vivo* la peau jusqu'à $200 \mu\text{m}$ de profondeur.

Il existe des solutions pour augmenter la gamme de profondeurs accessibles tout en gardant une bonne résolution.

Une première approche serait d'introduire un recalage dynamique du plan focal simultanément au balayage du plan d'imagerie. Avec les lentilles GRIN, on peut régler la distance de focalisation en sortie en changeant le plan focal en entrée, par exemple en déplaçant l'objectif qui injecte la lumière dans la GRIN. Cela a déjà été démontré avec succès [135] [48].

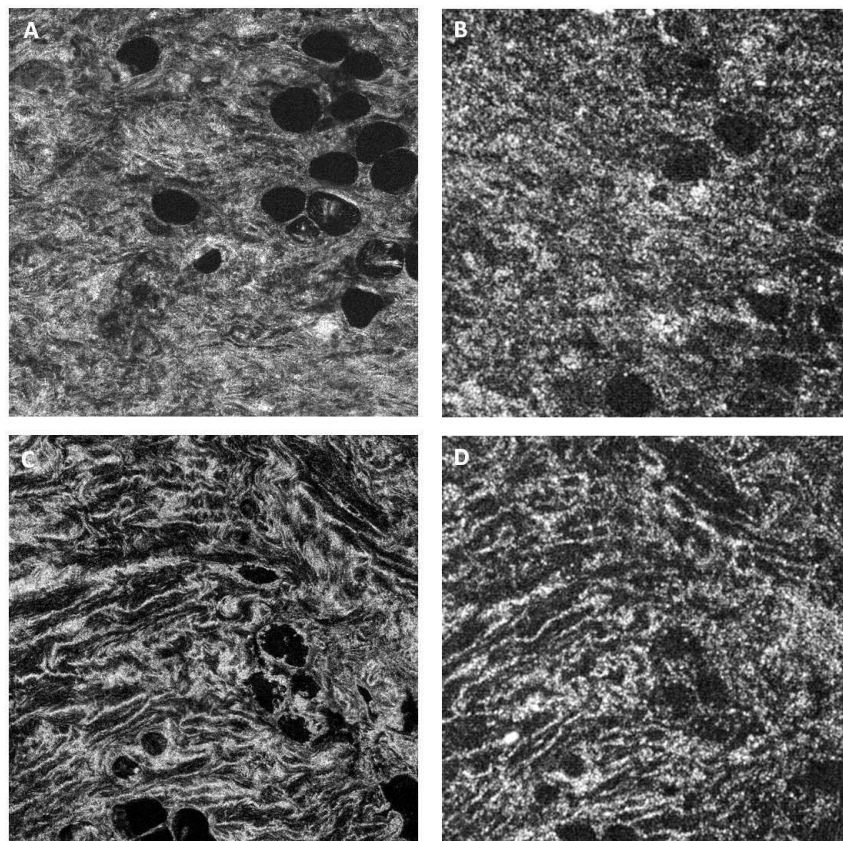


Figure 7.19 – Images d'échantillon de sein fixé *ex vivo*, profondeur 50 μm , avec le système commercial Light-CT (A) (C) et avec notre sonde rigide (B) (D).

Une autre approche est de modifier le système optique pour étendre la profondeur de champ tout en gardant une haute résolution. Cela peut se faire par exemple en utilisant un faisceau de lumière non plus Gaussien mais de Bessel créé par une lentille axicon. On peut ainsi conserver une résolution de 1.5 μm sur 200 μm de profondeur [47].

Portabilité

Comme nous l'avons vu sur la figure 7.7, le système à sonde rigide actuel est encombrant et ne peut être utilisé *in vivo* que sur des zones de la peau comme le bras ou le visage. Pour envisager des applications cliniques, il faut concevoir un système miniaturisé et portable à la main. Nous illustrons le principe d'un tel appareil sur la figure 7.20. L'interféromètre est miniaturisé (séparatrice et objectifs) et replié en 3D de manière à former une sorte de pistolet, dans le manche duquel se placent le bras de référence et la caméra.

7.3 Discussion

7.3.1 Comparaison des deux approches

Nous avons proposé dans ce chapitre deux approches pour un système de FFOCT en endoscopie rigide. Dans le système à deux interféromètres la sonde ne participe pas à la formation du signal interférométrique, tandis que dans le système à un interféromètre elle

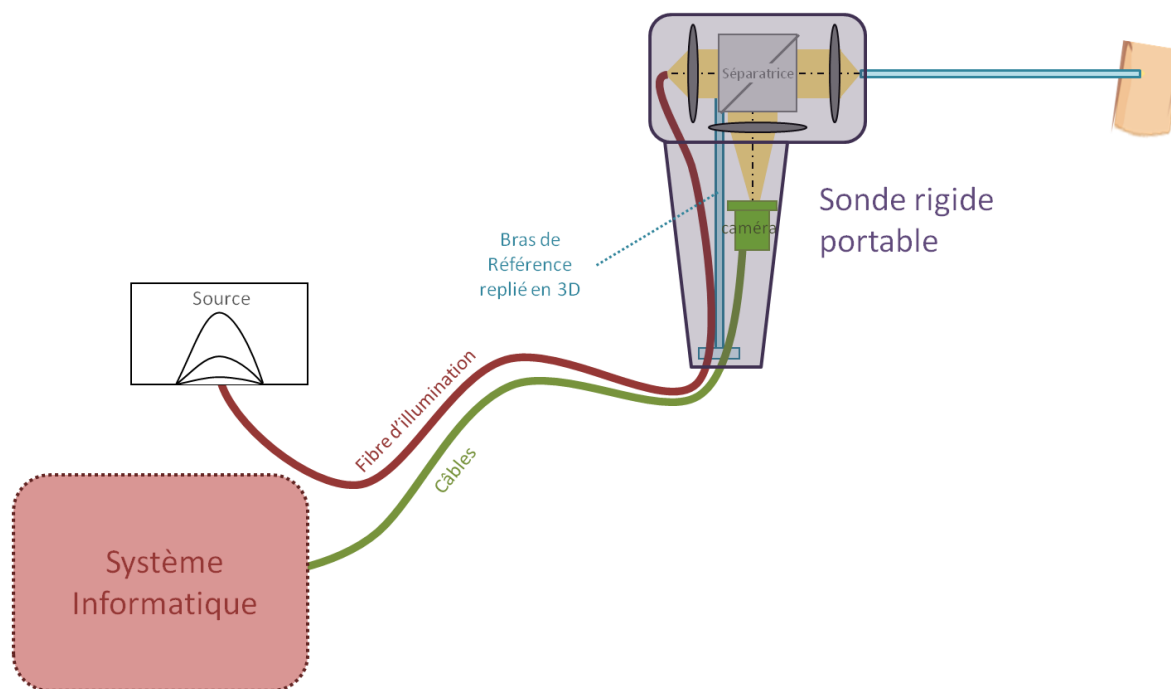


Figure 7.20 – Schéma d'un appareil de FFOCT à un interféromètre avec sonde rigide portable à la main.

appartient à l'un des bras. Dans les deux cas la sonde reste passive dans le sens qu'elle ne contient pas d'éléments mobiles à son extrémité distale, éléments qui nécessiteraient une miniaturisation complexe et coûteuse.

En termes de vitesse et de résolution, les deux techniques sont comparables et confrontées aux mêmes limitations.

L'avantage du système à deux interféromètres est qu'il demande un travail d'ingénierie moindre pour concevoir un appareil portable à la main (figure 7.5). En outre, la sonde n'appartenant pas à un interféromètre, le signal est plus robuste aux perturbations de l'environnement. Cependant la sensibilité du système est limitée, ce qui donne une qualité d'image moyenne.

Le système à un interféromètre doit être implémenté avec minutie pour véritablement obtenir un interféromètre portable, stable et insensible aux mouvements. En contrepartie, il est possible d'atteindre une qualité d'images similaire à celle de l'appareil de FFOCT *ex vivo*. En effet la sensibilité est meilleure dans le système à un interféromètre car la méthode de modulation du signal est intrinsèquement plus efficace (voir 2.3.2 page 23 et 4.1 page 46).

La considération de la sensibilité est l'élément déterminant qui nous conduit à préférer finalement l'approche à un interféromètre.

7.3.2 Conclusion

Nous avons établi la faisabilité de systèmes de FFOCT avec sonde rigide, et démontré une première utilisation *in vivo*. Nous prévoyons plusieurs améliorations, nécessaires pour disposer d'un véritable prototype d'imagerie médicale.

Deux applications cliniques majeures sont envisagées. D'une part, une sonde rigide de plusieurs millimètres de diamètre permettrait l'imagerie de la peau, notamment pour la dermatologie. D'autre part, une sonde fine pourrait imager les organes internes en pénétrant comme une aiguille, par exemple le sein, le cerveau, ou encore la prostate. Elle pourrait ainsi guider les biopsies et les gestes chirurgicaux, notamment en révélant la position des nerfs et des vaisseaux en amont de la sonde de manière à éviter au médecin de les endommager. Par ailleurs, dans le domaine de la recherche biomédicale, un tel système pourrait être utilisé pour l'imagerie du petit animal.

Conclusion et Perspectives

Bilan des travaux

Au cours de ces travaux expérimentaux, nous avons conçu et réalisé des montages endoscopiques d'OCT plein Champ.

Plus précisément nous avons travaillé différemment sur deux approches, en endoscopie souple et rigide :

L'endoscopie souple En décalant le problème du traitement du signal à l'extérieur de la sonde, grâce à l'utilisation de deux interféromètres couplés pour créer le signal d'OCT, nous disposons d'une sonde très simple et totalement passive, excluant ainsi toute contrainte sur sa conception. Les limitations sur le diamètre de la sonde, actuellement 0.9 mm, nous sont uniquement imposées par la gamme de faisceaux de fibres industriellement disponibles. En effet, les paramètres du faisceau que sont le diamètre, le nombre de pixels (nombre de fibres), la résolution (distance entre fibres) sont liés et un compromis doit être établi entre faible diamètre et bonne qualité d'image.

Les phénomènes de couplages inter- et intra-fibres nous ont conduit à complexifier le système, tout en s'attachant à conserver la passivité et la simplicité de la sonde.

L'approche a pu être validée comme preuve de concept pour l'imagerie future, mais des progrès restent à faire pour en envisager un développement clinique, principalement en termes de vitesse et de sensibilité.

L'endoscopie rigide Dans le cas de l'endoscopie rigide, nous avons réalisé des instruments de FFOCT simples dans leur principe et dans leur réalisation. Nous avons comparé les mérites de différentes approches, et démontré que l'on pouvait déjà utiliser l'appareil pour l'imagerie *in vivo* de la peau.

A la suite de ces travaux, la société LLTech, qui a soutenu cette thèse par une collaboration CIFRE, compte développer dans les trois prochaines années un système médical suivant ce principe.

Continuation du projet

Les prochaines étapes dans la continuation du projet consistent à améliorer la sensibilité de détection et la vitesse d'acquisition des systèmes pour atteindre une imagerie de bonne qualité en temps réel. Dans ce but, outre une conception mécanique et optique extrêmement précise des montages interférométriques, il est nécessaire de disposer d'une caméra spécialisée, rapide et disposant de grande dynamique, ainsi qu'une source de lumière puissante, incohérente spatialement et temporellement. Cela pourra se faire en développant un capteur CMOS dédié, un projet en collaboration européenne débutant en ce sens, et une source par assemblage de LEDs judicieusement choisies.

En outre, les caractéristiques de la sonde en elle-même, en termes de diamètre, du choix de visée frontale ou latérale, du compromis entre la taille du champ et la résolution, sont à définir à moyen terme en fonction de l'application visée.

Perspectives

Applications

Ces systèmes pourraient être utiles dans le domaine de la recherche biomédicale et l'imagerie du petit animal, mais nous avons surtout envisagé des applications cliniques, pour l'imagerie médicale.

Le Dr Guillemin, Directeur Général du centre anticancéreux Alexis Vautrin de Nancy, a déclaré "Dans quelques années il ne sera plus éthique de faire des biopsies excisionnelles" (Congrès SFLM, mars 2007). Dans cet esprit, notre ambition est de fournir au médecin, lors de l'endoscopie, des images lui permettant dans un premier temps de repérer les éventuelles zones pathologiques à biopsier, et à terme peut-être d'effectuer le diagnostic sans recourir à la biopsie.

Ainsi en gastroentérologie, la sonde souple pourrait être insérée dans le canal opératoire du coloscope durant la procédure classique, dans le cadre par exemple de la surveillance d'éventuels polypes. La sonde rigide, utilisée à la manière d'une aiguille, pourrait guider le geste de biopsie ou de chirurgie à l'intérieur des organes, notamment le sein ou le cerveau.

Multimodalité

Par ailleurs, d'autres techniques d'imagerie peuvent être couplées à l'OCT Plein Champ, à court ou à long terme, de manière à obtenir des images multimodales contenant plus d'information.

Elastographie Nous avons démontré ici qu'il était possible d'obtenir l'image élastographique en plus de l'image optique, en utilisant simplement la sonde pour produire une contrainte mécanique sur le tissu. Le contraste d'élasticité est potentiellement indicateur de l'état pathologique du tissu, et serait donc une aide supplémentaire au diagnostic.

Fluorescence Le couplage de l'OCT avec l'imagerie de fluorescence a déjà été réalisé en microscopie confocale et en microscopie multiphotonique. Si l'OCT apporte un contraste morphologique, la fluorescence apporte un contraste fonctionnel grâce à

l'ajout d'agents de contraste ciblés. Ces deux modalités donnent donc des informations complémentaires et leur couplage est particulièrement pertinent, de la même manière que le couplage des images morphologiques de rayons X CT (Computed Tomography) avec les images métaboliques de radioactivité PET (Positron Emission Tomography) a permis de meilleurs diagnostics cliniques.

Glossaire des abréviations et notions techniques

Nous rassemblons ici quelques abréviations et expliquons quelques notions qui sont couramment utilisées dans le manuscrit.

Abréviations courantes

λ Longueur d'onde, en μm .

σ Nombre d'onde, inverse de la longueur d'onde : $\sigma = 1/\lambda$, en cm^{-1} .

δ Différence de marche, c'est-à-dire différence de chemin optique parcouru entre les deux faisceaux d'un interféromètre (voire figure A.1), en μm .

NA Ouverture numérique d'un composant optique ('Numerical Aperture'), dépend de l'indice n du milieu et du demi-angle α du cône d'illumination comme $\text{NA} = n \sin\alpha$. Plus l'ouverture numérique est grande, plus les rayons inclinés

FOV Champ d'une image ('Field of View'), en $\text{mm} * \text{mm}$.

fps Fréquence d'affichage des images ('frames per second'), en s^{-1} .

Notions techniques

Endoscopie

Distal Extrémité de l'endoscope qui est en contact avec l'objet (ou le patient) à imager.

Proximal Extrémité de l'endoscope qui est du côté de l'opérateur.

Optique

Interférences Lorsque deux ondes cohérentes entre elles, E_1 et E_2 , sont combinées, il y a interférence : ce sont les amplitudes complexes de chaque onde et non leurs

intensités qui s'additionnent, de telle sorte qu'on peut obtenir en certains points l'équation surprenante :

$$\text{lumière} + \text{lumière} \longrightarrow \text{obscurité} \quad (\text{A.1})$$

Mathématiquement (sous forme simplifiée) :

$$I = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos\phi \quad (\text{A.2})$$

L'intensité résultante I oscille en fonction du déphasage ϕ entre deux valeurs extrêmes I_{\min} et I_{\max} :

$$I_{\min} = (\sqrt{I_1} - \sqrt{I_2})^2 \text{ et } I_{\max} = (\sqrt{I_1} + \sqrt{I_2})^2 \quad (\text{A.3})$$

La visibilité V de cette figure d'interférence est définie par :

$$V = \frac{I_{\min} - I_{\max}}{I_{\min} + I_{\max}} \quad (\text{A.4})$$

V est maximale pour $I_1 = I_2 = I_0$, l'intensité des franges varie alors entre 0 et $4 I_0$.

Cohérence Les sources lumineuses émettent de la lumière par suite de la désexcitation des atomes, sous la forme de trains d'onde de durée limitée (de l'ordre de 10^{-8} s) qui se succèdent de manière aléatoire en termes d'amplitude, de phase, et d'orientation. Pour qu'il y ait interférence entre deux ondes, il faut qu'elles proviennent du même train d'onde, sinon le déphasage ϕ est une fonction aléatoire de moyenne nulle sur le temps d'observation et on n'observe donc pas d'interférence. Deux ondes sont dites cohérentes si elles ont la capacité de produire des interférences.

Cohérence temporelle Pour une source à spectre étendu, chacune des composantes monochromatiques donne son propre système de franges d'interférences. On observe la *somme des intensités* produites par chaque composante spectrale. Comme la période ϕ du système de franges dépend de la longueur d'onde λ , ils se superposent et se brouillent. En introduisant un critère de netteté des franges, on définit la longueur de cohérence temporelle :

$$L_c = \frac{2\ln 2}{\pi} \frac{\lambda^2}{\Delta\lambda} \quad (\text{A.5})$$

Plus le spectre est large ($\Delta\lambda$ grand), plus le brouillage est important et L_c est faible. Dans le cas d'un interféromètre avec $\phi = \frac{2\pi}{\lambda} \delta$, la longueur de cohérence représente la différence de marche maximale au-delà de laquelle les interférences ne sont plus visibles.

Cohérence spatiale Pour une source étendue spatialement, chaque point source émet une onde lumineuse de façon indépendante, qui ne peut pas interférer avec l'onde émise par les autres points.

Interféromètre Dispositif optique divisant un faisceau de lumière d'entrée en deux faisceaux ou plus, et les recombinaient en sortie pour produire des interférences. L'inter-

féromètre le plus connu est celui de Michelson A.1.

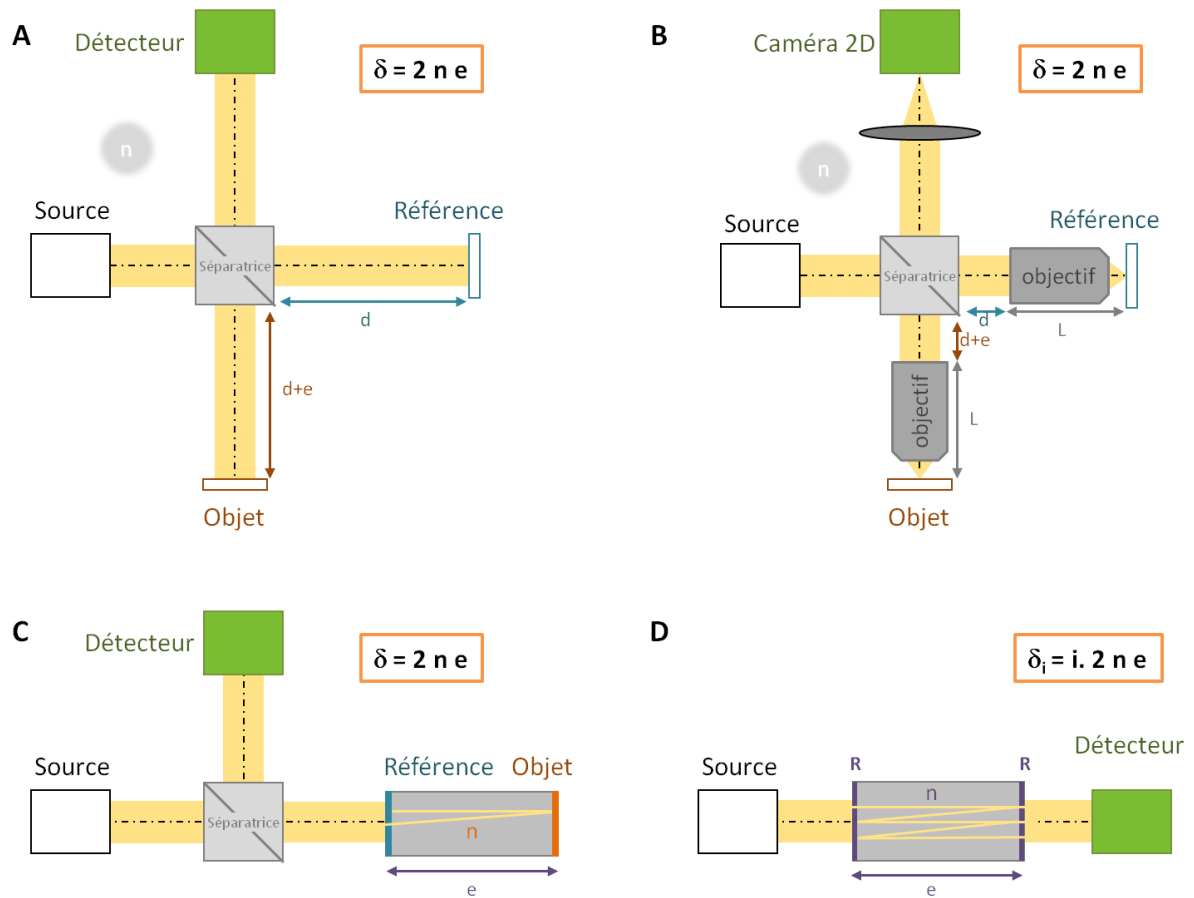


Figure A.1 – Schéma de principe de quelques interféromètres connus : Michelson (A), Linnik (B), Fizeau (C), Fabry-Pérot à réflexions multiples en transmission(D), avec expression de la différence de marche induite δ (en incidence normale).

Tavelures ou Speckle Lorsqu'on éclaire un milieu diffusant par une source cohérente, on observe en sortie une répartition non uniforme d'intensité (figure A.2). Cela est dû aux interférences entre les rayons diffusés : comme il existe de multiples chemins optiques, les photons empruntant ces chemins interfèrent de façon constructive ou destructive, ce qui donne ces grains appelés tavelures ou speckle.

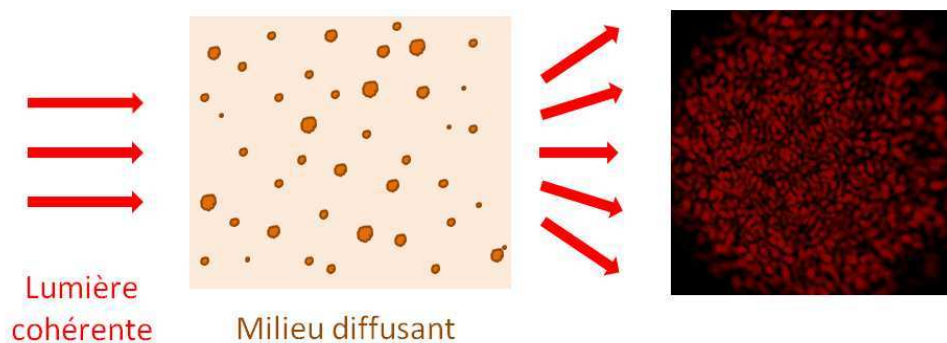


Figure A.2 – Création d'une figure de tavelures ou speckle lors de la traversée d'un milieu diffusant par une lumière cohérente.

Faisceau de fibres Assemblage de fibres optiques de manière cohérente afin de transporter une image pixélisée d'une extrémité à l'autre. Les fibres peuvent être collées tout le long du faisceau (fusion des gaines), ou seulement aux extrémités.

Lentille GRIN Lentille à gradient d'indice ('Graded Refractive INdex'), de forme cylindrique (figure A.4). L'indice en un point de la lentille à la distance r du centre est $n(r) = n_0(r) \operatorname{sech}(g r)$, avec g la constante de gradient. Les rayons lumineux effectuent un chemin courbé dans la lentille, de période appelé 'pitch' (figure A.3). Les lentilles ayant un pitch multiple de 0.5 transportent une image d'une extrémité à l'autre.

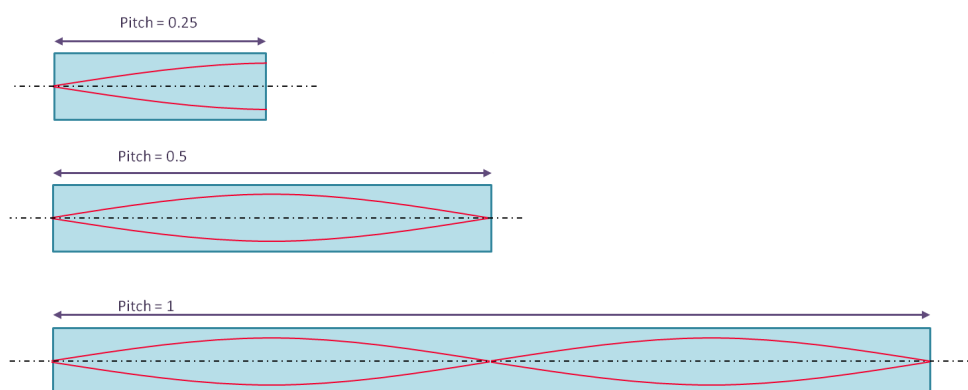


Figure A.3 – Trajet de la lumière dans des lentilles GRIN de pitch 0.25, 0.5, 1.



Figure A.4 – Lentilles GRIN de diamètre 2 mm et 1 mm.

Mire Objet présentant des motifs de fréquence contrôlée (grille, lignes..) permettant d'évaluer les performances, notamment la résolution, d'un appareil d'imagerie.

Phantom Echantillon modèle fabriqué pour évaluer les performances d'un appareil d'imagerie.

Gaussienne Fonction à décroissance exponentielle de la forme $f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}}$, de moyenne μ et d'écart-type σ .

Précisions sur le spectre cannelé

Considérons un interféromètre à division d'amplitude, de type Michelson par exemple ou de Fizeau, éclairé par une source de lumière blanche à large spectre $S(\sigma)$, comme représentés sur la figure B.1.

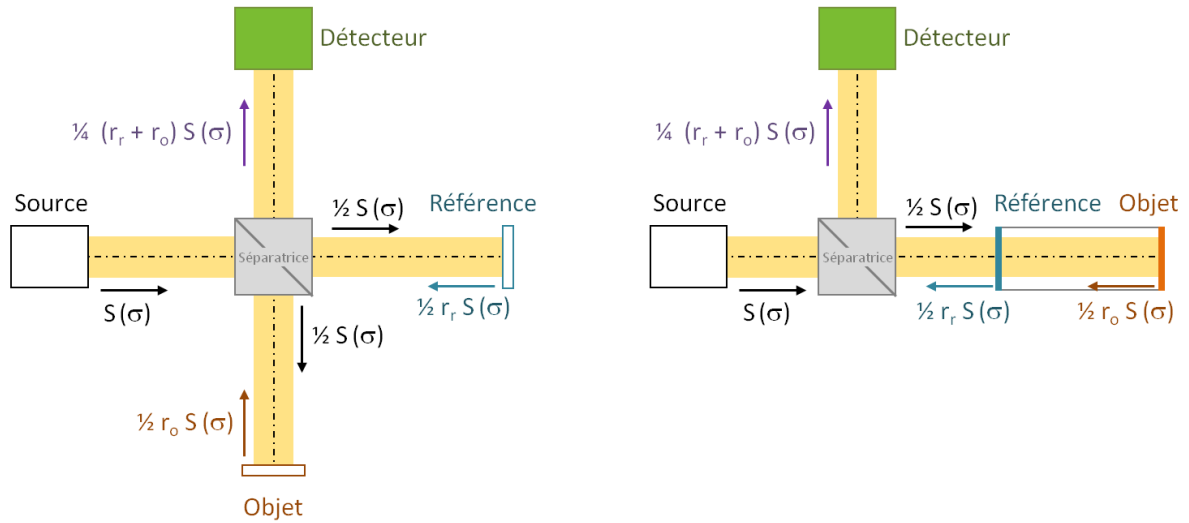


Figure B.1 – Interféromètres de type Michelson (gauche) et cavité optique de Fizeau (droite), avec détail des deux faisceaux : référence (surface de coefficient de réflexion en amplitude r_r) et objet (coefficient de réflexion en amplitude r_o). La lumière venant des réflexions multiples dans la cavité optique est négligée ici.

A un nombre d'onde donné σ , défini par $\sigma = \frac{1}{\lambda}$ (en cm^{-1}), le détecteur reçoit la recombinaison des faisceaux référence et objet qui ont une différence de marche δ :

$$S_{\text{sortie}}(\sigma) = \frac{1}{4} S(\sigma) (r_r + r_o \cos(2\pi \delta \sigma)) \quad (\text{B.1})$$

soit :

$$S_{\text{sortie}}(\sigma) = \frac{1}{4} S(\sigma) r_r \left(1 + \frac{r_o}{r_r} \cos(2\pi \delta \sigma) \right) \quad (\text{B.2})$$

D'où, en considérant r_r fixe et en posant le contraste $C = \frac{r_o}{r_r}$:

$$S_{\text{sortie}}(\sigma) \sim S(\sigma)(1 + C \cos(2\pi\delta\sigma)) \quad (\text{B.3})$$

On obtient donc en sortie de l'interféromètre un spectre dit cannelé, d'enveloppe $S(\sigma)$ modulé par une fonction sinusoïdale en $\cos(2\pi\delta\sigma)$. L'efficacité de cette modulation est caractérisée par le contraste C , elle est maximale pour $C=1$ soit $r_r=r_o$. La figure B.2 montre des spectres cannelés pour différents contrastes.

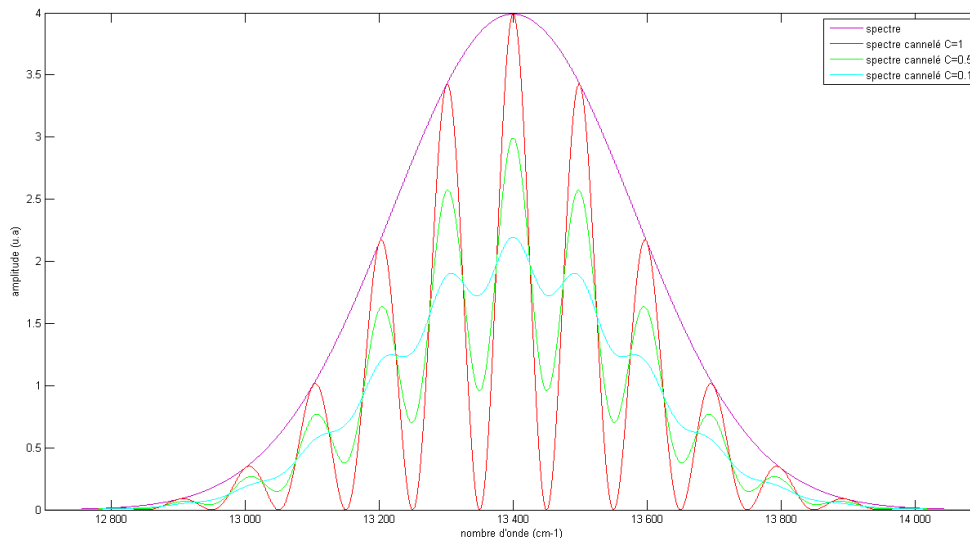


Figure B.2 – Spectre de la source (gaussienne) et spectres cannelés à une différence de marche de 100 μm , pour des contrastes de 1, 0.5 et 0.1 (calculs numériques).

Pour de faibles différences de marche, c'est-à-dire inférieures à la longueur de cohérence, on peut observer l'effet de ces cannelures à l'oeil nu. En effet pour certaines longueurs d'onde les interférences sont constructives et pour d'autres destructives. C'est ce phénomène qui crée les couleurs irisées que l'on voit à la surface des taches d'essence ou encore des bulles de savon (figure B.3). On peut d'ailleurs déduire de la couleur observée la différence de marche à l'origine des interférences, selon une échelle de nuances déjà établie par Isaac Newton, et appelée en conséquence les teintes de Newton. Lorsque la différence de marche dépasse la longueur de cohérence les franges de cannelures sont toujours présentes mais le peigne spectral qui en résulte est trop fin pour être distingué par notre oeil qui ne perçoit que du blanc, appelé 'blanc d'ordre supérieur'. Cependant on peut toujours observer le spectre cannelé à l'aide d'un spectromètre.

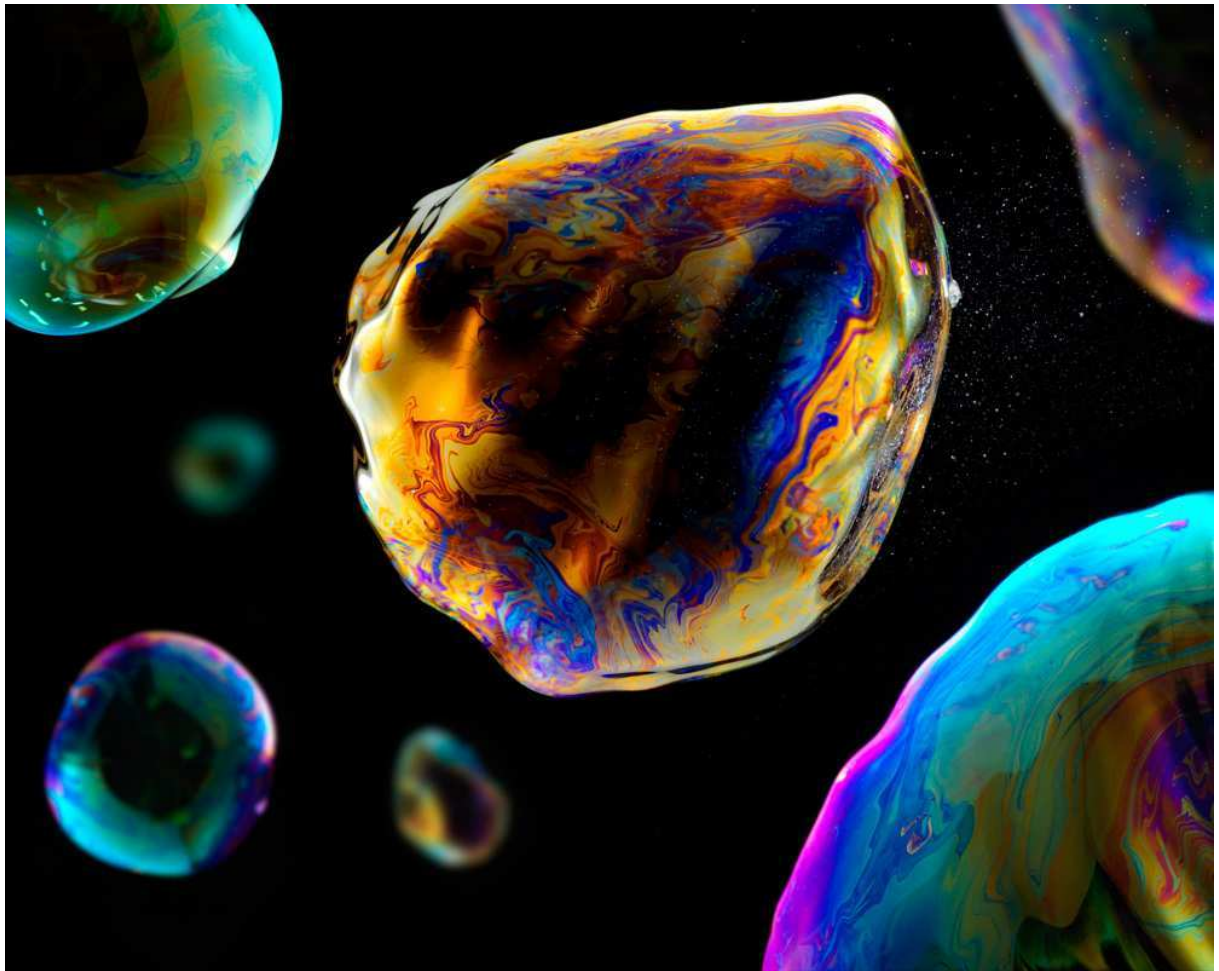


Figure B.3 – La beauté de la physique : irisations des bulles de savon (photographie Fabian Oefner).

Références

- [1] L.V. Wang and H.I. Wu. *Biomedical Optics - Principles and Imaging*. Wiley edition, 2007.
- [2] R. R. Anderson and J. A. Parrish. The optics of human skin. *The Journal of investigative dermatology*, 77(1) :13–19, 1981.
- [3] Vasan Venugopalan and Alfred Vogel. Mechanisms of Pulsed Laser Abalation of Biological Tissues. *Chemical Review*, 103 :577–644, 2003.
- [4] C.F. Bohren and D.R. Huffman. *Absorption and scattering of light by small particles*. New York, wiley inte edition, 1983.
- [5] W.F. Cheong, S.A. Prahl, and A.J. Welch. A review of the optical properties of biological tissues. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, 26(12) :2166–2185, 1990.
- [6] A. Ishimaru. *Wave Propagation and Scattering in Random Media*. Iee press edition, 1997.
- [7] C. Dunsby and P. M. W. French. Techniques for depth-resolved imaging through turbid media including coherence-gated imaging. *Journal of Physics D : Applied Physics*, 36 :207–227, 2003.
- [8] A P Gibson, J C Hebden, and S R Arridge. Recent advances in diffuse optical imaging. *Physics in Medicine and Biology*, 50(4), February 2005.
- [9] Leila Azizi, Katarzyna Zarychta, Dominique Ettori, Eric Tinet, and Jean-Michel Tualle. Ultimate spatial resolution with Diffuse Optical Tomography. *Optics express*, 17(14) :12132–44, July 2009.
- [10] M. Lauritzen and L. Gold. Brain function and neurophysiological correlates of signals used in functional neuroimaging. *Journal of Neuroscience*, (23) :3972–80, 2003.
- [11] Katherine L Perdue, Qianqian Fang, and Solomon G Diamond. Quantitative assessment of diffuse optical tomography sensitivity to the cerebral cortex using a whole-head probe. *Physics in medicine and biology*, 57(10) :2857–72, May 2012.
- [12] D Grosenick, K T Moesta, H Wabnitz, J Mucke, C Stroszczynski, R Macdonald, P M Schlag, and H Rinneberg. Time-domain optical mammography : initial cli-

- nical results on detection and characterization of breast tumors. *Applied Optics*, 42 :3170–86, 2003.
- [13] A.G. Bell. On the production and reproduction of sound by light. *American Journal of Sciences*, 20(118) :305–324, 1880.
 - [14] Lihong V Wang and Song Hu. Photoacoustic tomography : in vivo imaging from organelles to organs. *Science*, 335(6075) :1458–62, March 2012.
 - [15] Geng Ku, Xueding Wang, Xueyi Xie, George Stoica, and Lihong V Wang. Imaging of tumor angiogenesis in rat brains in vivo by photoacoustic tomography. *Applied optics*, 44(5) :770–5, February 2005.
 - [16] Dolfi D. and F. Micheron. Procédé et système d’imagerie par transillumination à marquage en fréquence des photons, 1989.
 - [17] Salma Farahi. *Méthodes holographiques et spectroscopiques appliquées à l’imagerie acousto-optique de milieux diffusants épais*. PhD thesis, 2011.
 - [18] Marvin Minsky. Microscopy apparatus, US3013467, 1957.
 - [19] Peter J Dwyer, Charles a DiMarzio, and Milind Rajadhyaksha. Confocal theta line-scanning microscope for imaging human tissues. *Applied optics*, 46(10) :1843–51, April 2007.
 - [20] Hans Skvara, Harald Kittler, Johannes a. Schmid, Ulrike Plut, and Constanze Jonak. In vivo fluorescence confocal microscopy : indocyanine green enhances the contrast of epidermal and dermal structures. *Journal of Biomedical Optics*, 16(9) :096010, 2011.
 - [21] Dan Gareau, Yogesh G Patel, Milind Rajadhyaksha, and Kishwer S Nehal. Applications of reflectance confocal microscopy : Surgical pathology-at-the-bedside to potentially guide Mohs surgery in real-time. *Proceedings of SPIE*, 2009.
 - [22] J K Karen, D S Gareau, S W Dusza, M Tudisco, M Rajadhyaksha, and K S Nehal. Detection of basal cell carcinomas in Mohs excisions with fluorescence confocal mosaicing microscopy. *The British journal of dermatology*, 160(6) :1242–50, June 2009.
 - [23] J. Mertz. Optical sectioning microscopy with planar or structured illumination. *Nature Methods*, 8 :811–819, 2011.
 - [24] Peter Kner, Bryant B Chhun, Eric R Griffis, Lukman Winoto, and Mats G L Gustafsson. Super-resolution video microscopy of live cells by structured illumination. *Nature methods*, 6(5) :339–42, May 2009.
 - [25] M G Gustafsson. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *Journal of Microscopy*, 198(2) :82–87, May 2000.
 - [26] M. Göppert-Mayer. Über elementarakte mit zwei quanten-sprüngen. *Ann phys*, 9 :273–295, 1931.
 - [27] W. Kaiser and CGB. Garrett. Two-photon excitation in $\text{CaF}_2\text{Eu}^{2+}$. *Physical review letters*, 7 :229–31, 1961.
 - [28] W. Denk, J.H. Strickler, and W.W. Webb. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248(4951) :73–76, 1990.

- [29] Pascal Dufour, Suzie Dufour, Annie Castonguay, Nathalie McCarthy, and Yves De Koninck. Microscopie à deux photons pour l'imagerie cellulaire fonctionnelle : avantages et enjeux. *Medecine Sciences*, 22 :837–44, 2006.
- [30] Jerome Mertz. Nonlinear microscopy : new techniques and applications. *Current opinion in neurobiology*, 14(5) :610–6, October 2004.
- [31] K König. Multiphoton microscopy in life sciences. *Journal of Microscopy*, 200(2) :83–104, 2000.
- [32] W Cai, S K Gayen, M Xu, M Zevallos, M Alrubaiee, M Lax, and R R Alfano. Optical tomographic image reconstruction from ultrafast time-sliced transmission measurements. *Applied optics*, 38(19) :4237–46, July 1999.
- [33] L. Wang, P. P. Ho, X. Liang, H. Dai, and R. R. Alfano. Kerr - Fourier imaging of hidden objects in thick turbid media. *Optics letters*, 18(3) :241–243, 1993.
- [34] K.M. Yoo, Q. Xing, and R.R. Alfano. Imaging objects hidden in highly scattering media using femtosecond second-harmonic-generation cross-correlation time gating. *Optics letters*, 16(13) :1019–1021, 1991.
- [35] M.D. Duncan, R. Mahon, L.L. Tankersley, and J. Reintjes. Time-gated imaging through scattering media using stimulated Raman amplification. *Optics letters*, 16(23) :1868–1870, 1992.
- [36] Karl. A. Stetson. Holographic Fog Penetration. *Journal of the Optical Society of America*, 57(8) :1060–1061, 1967.
- [37] S C Hyde, N P Barry, R Jones, J C Dainty, P M French, M B Klein, and B a Wechsler. Depth-resolved holographic imaging through scattering media by photorefraction. *Optics letters*, 20(11) :1331–3, June 1995.
- [38] E Cuche, P Marquet, and C Depeursinge. Simultaneous amplitude-contrast and quantitative phase-contrast microscopy by numerical reconstruction of Fresnel off-axis holograms. *Applied optics*, 38(34) :6994–7001, December 1999.
- [39] D. Huang, E.A. Swanson, C.P. Lin, J.S. Schuman, W.G. Stinson, W. Chang, M.R. Hee, T. Flotte, K. Gregory, C.A. Puliafito, and J.G. Fujimoto. Optical Coherence Tomography. *Science*, 254 :1178–1181, 1991.
- [40] G J Tearney, M E Brezinski, J F Southern, B E Bouma, S a Boppart, and J G Fujimoto. Optical biopsy in human pancreatobiliary tissue using optical coherence tomography. *Digestive diseases and sciences*, 43(6) :1193–9, June 1998.
- [41] Isaac Newton. *Optics or, a treatise of the reflexions, refractions, inflexions and colours of light : also two treatises of the species and magnitude of curvilinear figures*. 1704.
- [42] A F Fercher, K Mengedoht, and W Werner. Eye-length measurement by interferometry with partially coherent light. *Optics letters*, 13(3) :186–8, March 1988.
- [43] José-Philippe Pérez. *Optique, fondements et applications*. Dunod, 2004.
- [44] Wolfgang Drexler and James G Fujimoto, editors. *Optical Coherence Tomography, Technology and Applications*. Springer edition, 2008.
- [45] A. F. Fercher, C. K. Hitzenberger, G. Kamp, and S. Y. El-Zaiat. Measurement of intraocular distances by backscattering spectral interferometry. *Opt. Commun.*, 117 :43–48, 1995.

- [46] Johannes F de Boer, Barry Cense, B Hyle Park, Mark C Pierce, Guillermo J Tearney, and Brett E Bouma. Improved signal-to-noise ratio in spectral-domain compared with time-domain optical coherence tomography. *Optics letters*, 28(21) :2067–9, November 2003.
- [47] R A Leitgeb, M Villiger, A H Bachmann, L Steinmann, and T Lasser. Extended focus depth for Fourier domain optical coherence microscopy. *Optics letters*, 31(16) :2450–2, August 2006.
- [48] Aaron D Aguirre, Juergen Sawinski, Shu-Wei Huang, Chao Zhou, Winfried Denk, and James G Fujimoto. High speed optical coherence microscopy with autofocus adjustment and a miniaturized endoscopic imaging probe. *Optics express*, 18(5) :4222–39, March 2010.
- [49] Martin Villiger, Christophe Pache, and Theo Lasser. Dark-field optical coherence microscopy. *Optics letters*, 35(20) :3489–91, October 2010.
- [50] Hongwu Ren, Kjell Morten Brecke, Zhihua Ding, Yonghua Zhao, J Stuart Nelson, and Zhongping Chen. Imaging and quantifying transverse flow velocity with the Doppler bandwidth in a phase-resolved functional optical coherence tomography. *Optics letters*, 27(6) :409–11, March 2002.
- [51] Changhuei Yang, Laura E L McGuckin, John D Simon, Michael a Choma, Brian E Applegate, and Joseph a Izatt. Spectral triangulation molecular contrast optical coherence tomography with indocyanine green as the contrast agent. *Optics letters*, 29(17) :2016–8, September 2004.
- [52] Dirk J Faber, Egbert G Mik, Maurice C G Aalders, and Ton G van Leeuwen. Toward assessment of blood oxygen saturation by spectroscopic optical coherence tomography. *Optics letters*, 30(9) :1015–7, May 2005.
- [53] Olivier Karim Naoun, Valérie Louis Dorr, Paul Allé, Jean-Christophe Sablon, and Anne-Marie Benoit. Exploration of the retinal nerve fiber layer thickness by measurement of the linear dichroism. *Applied optics*, 44(33) :7074–82, November 2005.
- [54] E Beaurepaire, A Claude Boccara, M Lebec, L Blanchot, and H Saint-Jalmes. Full-field optical coherence microscopy. *Optics letters*, 23(4) :244–6, February 1998.
- [55] L Vabre, A Dubois, and A Claude Boccara. Thermal-light full-field optical coherence tomography. *Optics letters*, 27(7) :530–2, April 2002.
- [56] Arnaud Dubois, Kate Grieve, Gael Moneron, Romain Lecaue, Laurent Vabre, and A C Boccara. Ultrahigh-resolution full-field optical coherence tomography. *Applied Optics*, 43(14) :2874–2883, 2004.
- [57] D M Gale, M I Pether, and J C Dainty. Linnik microscope imaging of integrated circuit structures. *Applied optics*, 35(1) :131–48, January 1996.
- [58] A Dubois. Phase-map measurements by interferometry with sinusoidal phase modulation and four integrating buckets. *Journal of the Optical Society of America. A*, 18(8) :1972–9, August 2001.
- [59] J M Lamarre. Photon noise in photometric instruments at far-infrared and submillimeter wavelengths. *Applied optics*, 25(6) :870–876, 1986.

- [60] F Harms, E Dalimier, P Vermeulen, A Fragola, and A C Boccara. Multimodal Full-Field Optical Coherence Tomography on biological tissue : toward all optical digital pathology. *Proceedings of SPIE*, 2012.
- [61] Manu Jain, Nidhi Shukla, Maryem Manzoor, Sylvie Nadolny, and Sushmita Mukherjee. Modified full-field optical coherence tomography : A novel tool for rapid histology of tissues. *Journal of Pathology Informatics*, 2(1) :28, 2011.
- [62] Adriano Burcheri-Curatolo. *Advances of Full-Field Optical Coherence Tomography for clinical applications and developmental biology*. PhD thesis, 2012.
- [63] L J DiNardo, J Lin, L S Karageorge, and C N Powers. Accuracy, utility, and cost of frozen section margins in head and neck cancer surgery. *The Laryngoscope*, 110(10 Pt 1) :1773–6, October 2000.
- [64] Reina Haque, Richard Contreras, Michael P McNicoll, Evelyn C Eckberg, and Diana B Petitti. Surgical margins and survival after head and neck cancer surgery. *BMC ear, nose, and throat disorders*, 6(2), January 2006.
- [65] Lisa Jacobs. Positive margins : the challenge continues for breast surgeons. *Annals of surgical oncology*, 15(5) :1271–2, May 2008.
- [66] Osnath Assayag, Martine Antoine, Brigitte Sigal-Zafrani, Michael Riben, Fabrice Harms, Adriano Burcheri, Kate Grieve, Eugénie Dalimier, Bertrand Le Conte de Poly, and Claude Boccara. Large Field, High Resolution Full-Field Optical Coherence Tomography : a pre-clinical study of human breast tissue and cancer assessment. *Technology in Cancer Research and Treatment*, 2012.
- [67] Eugénie Dalimier and Denis Salomon. Full-field optical coherence tomography : a new technology for 3D high-resolution skin imaging. *Dermatology*, 224(1) :84–92, January 2012.
- [68] D Heresbach. Recommandations pour la polypectomie lors de l’endoscopie digestive basse. *Acta Endoscopica*, (1) :705–708, 2007.
- [69] D. Heresbach, B. Napoléon, and J.-C. Delchier. Consensus en Endoscopie Digestive : Indications des biopsies digestives au cours de la fibroscopie. *Acta Endoscopica*, 2009.
- [70] Olympus. Medical endoscopy. *Olympus observer*, 2008.
- [71] Rajvinder Singh, SweeLin Chen Yi Mei, and Sandeep Sethi. Advanced endoscopic imaging in Barrett’s oesophagus : a review on current practice. *World journal of gastroenterology : WJG*, 17(38) :4271–6, October 2011.
- [72] Hany Shehab. Chromoendoscopy in gastroenterology. *Arab Journal of Gastroenterology*, 11(1) :1–17, 2010.
- [73] Anna M Buchner, Muhammad W Shahid, Michael G Heckman, Murli Krishna, Marwan Ghabril, Muhammad Hasan, Julia E Crook, Victoria Gomez, Massimo Raimondo, Timothy Woodward, Herbert C Wolfsen, and Michael B Wallace. Comparison of probe-based confocal laser endomicroscopy with virtual chromoendoscopy for classification of colon polyps. *Gastroenterology*, 138(3) :834–42, March 2010.
- [74] K Shibuya, H Hoshino, M Chiyo, a Iyoda, S Yoshida, Y Sekine, T Iizasa, Y Saitoh, M Baba, K Hiroshima, H Ohwada, and T Fujisawa. High magnification bron-

- chovideoscopy combined with narrow band imaging could detect capillary loops of angiogenic squamous dysplasia in heavy smokers at high risk for lung cancer. *Thorax*, 58(11) :989–95, November 2003.
- [75] Tony E Yusuf, Gavin C Harewood, Jonathan E Clain, and Michael J Levy. International survey of knowledge of indications for EUS. *Gastrointestinal endoscopy*, 63(1) :107–11, January 2006.
- [76] Eric de Kerviler, Cédric de Bazelaire, Nicolas Mounier, Olivier Mathieu, Benoît Brethon, Josette Brière, Jean-Pierre Marolleau, Pauline Brice, Christian Gisselbrecht, and Jacques Frija. Image-guided core-needle biopsy of peripheral lymph nodes allows the diagnosis of lymphomas. *European radiology*, 17(3) :843–9, March 2007.
- [77] Jonathan T C Liu, Nathan O Loewke, Michael J Mandella, Richard M Levenson, and Consulting Group. Review Article : Modern Trends in Imaging II Point-of-care pathology with miniature microscopes. *Analytical Cellular Pathology*, 34 :81–98, 2011.
- [78] Yi Yang, Xiang Li, Tianheng Wang, Patrick D Kumavor, Andres Aguirre, Kirk K Shung, Qifa Zhou, Melinda Sanders, Molly Brewer, and Quing Zhu. Integrated optical coherence tomography, ultrasound and photoacoustic imaging for ovarian tissue characterization. *Biomedical optics express*, 2(9) :2551–61, September 2011.
- [79] Krista Jansen, Antonius F W van der Steen, Heleen M M van Beusekom, J Wolter Oosterhuis, and Gijs van Soest. Intravascular photoacoustic imaging of human coronary atherosclerosis. *Optics letters*, 36(5) :597–9, March 2011.
- [80] A F Gmitro and D Aziz. Confocal microscopy through a fiber-optic imaging bundle. *Optics letters*, 18(8) :565, April 1993.
- [81] Hyun-Joon Shin, Mark C Pierce, Daesung Lee, Hyejun Ra, Olav Solgaard, and Rebecca Richards-Kortum. Fiber-optic confocal microscope using a MEMS scanner and miniature objective lens. *Optics express*, 15(15) :9113–22, July 2007.
- [82] G J Tearney, R H Webb, and B E Bouma. Spectrally encoded confocal microscopy. *Optics letters*, 23(15) :1152–4, August 1998.
- [83] M Rajadhyaksha, S González, J M Zavislan, R R Anderson, and R H Webb. In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin II : advances in instrumentation and comparison with histology. *The Journal of investigative dermatology*, 113(3) :293–303, September 1999.
- [84] Richard C Newton, Samuel V Kemp, Pallav L Shah, Daniel Elson, Ara Darzi, Kiyoshi Shibuya, Stephen Mulgrew, and Guang-Zhong Yang. Progress toward optical biopsy : bringing the microscope to the patient. *Lung*, 189(2) :111–9, April 2011.
- [85] Anthony a Tanbakuchi, Andrew R Rouse, Joshua a Udovich, Kenneth D Hatch, and Arthur F Gmitro. Clinical confocal microlaparoscope for real-time in vivo optical biopsies. *Journal of biomedical optics*, 14(4) :044030, 2009.
- [86] Houssine Makhoulouf, Andrew R Rouse, and Arthur F Gmitro. Dual modality fluorescence confocal and spectral-domain optical coherence tomography microendoscope. *Biomedical optics express*, 2(3) :634–44, January 2011.

- [87] Sarita Nori, Francisca Rius-Díaz, Jesus Cuevas, Mark Goldgeier, Pedro Jaen, Abel Torres, and Salvador González. Sensitivity and specificity of reflectance-mode confocal microscopy for in vivo diagnosis of basal cell carcinoma : a multicenter study. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 51(6) :923–30, December 2004.
- [88] Nam Q Nguyen and Rupert W L Leong. Current application of confocal endomicroscopy in gastrointestinal disorders. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 23(10) :1483–91, October 2008.
- [89] Luc Thiberville, Sophie Moreno-Swirc, Tom Vercauteren, Eric Peltier, Charlotte Cavé, and Genevieve Bourg Heckly. In vivo imaging of the bronchial wall microstructure using fibered confocal fluorescence microscopy. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 175(1) :22–31, January 2007.
- [90] L Thiberville, M Salaun, S Lachkar, S Dominique, S Moreno-Swirc, C Vever-Bizet, and G Bourg-Heckly. Human in vivo fluorescence microimaging of the alveolar ducts and sacs during bronchoscopy. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*, 33(5) :974–85, May 2009.
- [91] Ching Yong Yick, Jan H von der Thüsen, Elisabeth H Bel, Peter J Sterk, and Peter W Kunst. In vivo imaging of the airway wall in asthma : fibered confocal fluorescence microscopy in relation to histology and lung function. *Respiratory research*, 12(1) :85, January 2011.
- [92] Tom Vercauteren, Aymeric Perchant, Grégoire Malandain, Xavier Pennec, and Nicholas Ayache. Robust mosaicing with correction of motion distortions and tissue deformations for in vivo fibered microscopy. *Medical image analysis*, 10(5) :673–92, October 2006.
- [93] David R Rivera, Christopher M Brown, Dimitre G Ouzounov, Watt W Webb, and Chris Xu. Use of a lensed fiber for a large-field-of-view, high-resolution, fiber-scanning microendoscope. *Optics letters*, 37(5) :881–883, 2012.
- [94] David M Huland, Christopher M Brown, Scott S Howard, Dimitre G Ouzounov, Ina Pavlova, Ke Wang, David R Rivera, Watt W Webb, and Chris Xu. In vivo imaging of unstained tissues using long gradient index lens multiphoton endoscopic systems. *Biomedical optics express*, 3(5) :1077–85, May 2012.
- [95] Robert P J Barretto, Tony H Ko, Juergen C Jung, Tammy J Wang, George Capps, Allison C Waters, Yaniv Ziv, Alessio Attardo, Lawrence Recht, and Mark J Schnitzer. Time-lapse imaging of disease progression in deep brain areas using fluorescence microendoscopy. *Nature medicine*, 17(2) :223–228, January 2011.
- [96] G .J. Tearney, M.E. Brezinski, B.E. Bouma, S.A. Boppart, C. Pitris, J.F. Southern, and J.G. Fujimoto. In Vivo Endoscopic Optical Biopsy with Optical Coherence Tomography. *Science*, 276(5321) :2037–2039, June 1997.
- [97] Chenyang Xu, Joseph M Schmitt, Stephane G Carlier, and Renu Virmani. Characterization of atherosclerosis plaques by measuring both backscattering and attenuation coefficients in optical coherence tomography. *Journal of biomedical optics*, 13(3) :034003, 2011.

- [98] Francesco Prati, Evelyn Regar, Gary S Mintz, Eloisa Arbustini, Carlo Di Mario, Ik-Kyung Jang, Takashi Akasaka, Marco Costa, Giulio Guagliumi, Eberhard Grube, Yukio Ozaki, Fausto Pinto, and Patrick W J Serruys. Expert review document on methodology, terminology, and clinical applications of optical coherence tomography : physical principles, methodology of image acquisition, and clinical application for assessment of coronary arteries and atherosclerosis. *European heart journal*, 31(4) :401–15, February 2010.
- [99] Jiechen Yin, Xiang Li, Joe Jing, Jiawen Li, David Mukai, Sari Mahon, Ahmad Edris, Khiet Hoang, K. Kirk Shung, Matthew Brenner, Jagat Narula, Qifa Zhou, and Zhongping Chen. Novel combined miniature optical coherence tomography ultrasound probe for in vivo intravascular imaging. *Journal of Biomedical Optics*, 16(6) :060505, 2011.
- [100] Stephen Lam, Beau Standish, Corisande Baldwin, Annette McWilliams, Jean Le-Riche, Adi Gazdar, Alex I Vitkin, Victor Yang, Norihiko Ikeda, and Calum MacAulay. In vivo optical coherence tomography imaging of preinvasive bronchial lesions. *Clinical cancer research*, 14(7) :2006–11, April 2008.
- [101] X Li, C Chudoba, T Ko, C Pitris, and J G Fujimoto. Imaging needle for optical coherence tomography. *Optics letters*, 25(20) :1520–2, October 2000.
- [102] Boon Y Yeo, Robert a McLaughlin, Rodney W Kirk, and David D Sampson. Enabling freehand lateral scanning of optical coherence tomography needle probes with a magnetic tracking system. *Biomedical optics express*, 3(7) :1565–78, July 2012.
- [103] Bryden C. Quirk, Robert a. McLaughlin, Andrea Curatolo, Rodney W. Kirk, Peter B. Noble, and David D. Sampson. In situ imaging of lung alveoli with an optical coherence tomography needle probe. *Journal of Biomedical Optics*, 16(3) :036009, 2011.
- [104] D Lorensen, X Yang, R W Kirk, B C Quirk, R a McLaughlin, and D D Sampson. Ultrathin side-viewing needle probe for optical coherence tomography. *Optics letters*, 36(19) :3894–6, October 2011.
- [105] Kelsey M Kennedy, Brendan F Kennedy, Robert a McLaughlin, and David D Sampson. Needle optical coherence elastography for tissue boundary detection. *Optics letters*, 37(12) :2310–2, June 2012.
- [106] Vrushali R. Korde, Erica Liebmann, and Jennifer K. Barton. Design of a handheld optical coherence microscopy endoscope. *Journal of Biomedical Optics*, 16(6), 2011.
- [107] Chia-Pin Liang, Jeremiah Wierwille, Thais Moreira, Gary Schwartzbauer, M. Samir Jafri, Cha-Min Tang, and Yu Chen. A forward-imaging needle-type OCT probe for image guided stereotactic procedures. *Optics Express*, 19(27) :26283–26294, December 2011.
- [108] H. D. Ford, R. Beddows, P. Casaubieilh, and R. P. Tatam. Comparative signal-to-noise analysis of fibre-optic based optical coherence tomography systems. *Journal of Modern Optics*, 52(14) :1965–1979, September 2005.
- [109] W-Y Oh, B E Bouma, N Iftimia, R Yelin, and G J Tearney. Spectrally-modulated

- full-field optical coherence microscopy for ultrahigh-resolution endoscopic imaging. *Optics express*, 14(19) :8675–84, September 2006.
- [110] H D Ford and R P Tatam. Fibre imaging bundles for full-field optical coherence tomography. *Measurement Science and Technology*, 18(9) :2949–2957, September 2007.
- [111] Helen D Ford and Ralph P Tatam. Characterization of optical fiber imaging bundles for swept-source optical coherence tomography. *Applied optics*, 50(5) :627–40, February 2011.
- [112] Jacques Bures. *Optique guidée : fibres optiques et composants passifs tout-fibre*. Presses Internationales Polytechnique, 2009.
- [113] Kristen L Reichenbach and Chris Xu. Numerical analysis of light propagation in image fibers or coherent fiber bundles. *Optics express*, 15(5) :2151–65, March 2007.
- [114] Ajoy Ghatak and K. Thyagarajan. *An Introduction to Fiber Optics*. Cambridge University Press, 1998.
- [115] Sara M Landau, Chen Liang, Robert T Kester, Tomasz S Tkaczyk, and Michael R Descour. Design and evaluation of an ultra-slim objective for in-vivo deep optical biopsy. *Optics express*, 18(5) :4758–75, March 2010.
- [116] B. Saleh and M. Teich. *Fundamentals of Photonics*. Wiley-Interscience, 1991.
- [117] Sean a Burgess, Désirée Ratner, Brenda R Chen, and Elizabeth M C Hillman. Fiber-optic and articulating arm implementations of laminar optical tomography for clinical applications. *Biomedical optics express*, 1(3) :780–790, January 2010.
- [118] Jae-Ho Han, Junghoon Lee, and Jin U Kang. Pixelation effect removal from fiber bundle probe based optical coherence tomography imaging. *Optics express*, 18(7) :7427–39, March 2010.
- [119] Detlef Ruprecht and Heinrich Müller. *Image Warping With Scattered Data Interpolation Methods*. Dekanat Informatik, Univ., 1992.
- [120] Seungyong Lee, George Wolberg, and Sung Yong Shin. Scattered Data Interpolation with Multilevel B-Splines. *IEEE transactions on visualization and computer graphics*, 3(3) :1–17, 1997.
- [121] Woonggyu Jung, Wladimir Benalcazar, Adeel Ahmad, Utkarsh Sharma, Haohua Tu, and Stephen a Boppart. Numerical analysis of gradient index lens-based optical coherence tomography imaging probes. *Journal of biomedical optics*, 15(6) :066027, 2010.
- [122] Jennifer L. Rouke and Duncan T. Moore. Birefringence in gradient-index rod lenses : a direct measurement method and interferometric polarization effects. *Applied Optics*, 40(28) :4971–4980, 2001.
- [123] Marcial Montoya-hernandez and Daniel Malacara-hernandez. Polarization effects in interferograms of radial GRIN rods. *Optics Communication*, 175 :259–263, 2000.
- [124] Juliette Ben Arous, Jonas Binding, Jean-François Léger, Mariano Casado, Piotr Topilko, Sylvain Gigan, a Claude Boccara, and Laurent Bourdieu. Single myelin fiber imaging in living rodents without labeling by deep optical coherence microscopy. *Journal of biomedical optics*, 16(11) :116012, November 2011.

- [125] S Suresh. Biomechanics and biophysics of cancer cells. *Acta Materialia*, 55(12) :3989–4014, July 2007.
- [126] K J Parker, M M Doyley, and D J Rubens. Corrigendum : Imaging the elastic properties of tissue : the 20 year perspective. *Physics in Medicine and Biology*, 57(16) :5359–5360, August 2012.
- [127] Y P Zheng, S L Bridal, J Shi, a Saied, M H Lu, B Jaffre, a F T Mak, and P Laugier. High resolution ultrasound elastomicroscopy imaging of soft tissues : system development and feasibility. *Physics in Medicine and Biology*, 49(17) :3925–3938, September 2004.
- [128] J Schmitt. OCT elastography : imaging microscopic deformation and strain of tissue. *Optics express*, 3(6) :199–211, September 1998.
- [129] Cuiru Sun, Beau Standish, and Victor X. D. Yang. Optical coherence elastography : current status and future applications. *Journal of Biomedical Optics*, 16(4) :043001, 2011.
- [130] Ophir, Céspedes I, Ponnekanti H, Yazdi Y, and Li X. Elastography : a quantitative method for imaging the elasticity of biological tissues. *Ultrasonic Imaging*, 13(2) :111–134, 1991.
- [131] O. a. Shergold and N. a. Fleck. Mechanisms of deep penetration of soft solids, with application to the injection and wounding of skin. *Proceedings of the Royal Society A : Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 460(2050) :3037–3058, October 2004.
- [132] Oliver a. Shergold and Norman a. Fleck. Experimental Investigation Into the Deep Penetration of Soft Solids by Sharp and Blunt Punches, With Application to the Piercing of Skin. *Journal of Biomechanical Engineering*, 127(5) :838, 2005.
- [133] Brendan F Kennedy, Xing Liang, Steven G Adie, Derek K Gerstmann, Bryden C Quirk, Stephen A Boppart, and David D Sampson. In vivo three-dimensional optical coherence elastography. *Optics Express*, 19(7) :6623–6634, 2011.
- [134] Marjan Razani, Adrian Mariampillai, Cuiru Sun, Timothy W H Luk, Victor X D Yang, and Michael C Kolios. Feasibility of optical coherence elastography measurements of shear wave propagation in homogeneous tissue equivalent phantoms. *Biomedical optics express*, 3(5) :972–80, May 2012.
- [135] Tuqiang Xie, Shuguang Guo, Zhongping Chen, David Mukai, and Matthew Brenner. GRIN lens rod based probe for endoscopic spectral domain optical coherence tomography with fast dynamic focus tracking. *Optics express*, 14(8) :3238–46, April 2006.